





Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der I. Medizinischen Klinik der Universität München
Direktor: Prof. Dr. H. SCHWIEGK

"Untersuchungen zur Struktur- und Antigen-
Analyse von γ G-Globulinen und Paraproteinen"

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Klaus Z e i l l e r
aus Landsberg/L

München 1967

München 1966

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Referent: Priv.Doiz.Dr.M.KNEDEL

Korreferent: Prof.Dr.H.SCHWIEGK

Dekan: Prof.Dr.M.KIESE

Tag der mündlichen Prüfung: 31. Juli 1967

INHALTSVERZEICHNIS

A.	EINLEITUNG	5
B.	MÖGLICHKEITEN DER FRAGMENTIERUNG	5
1.	Dissoziation durch Erhitzen auf 90 ° C	5
2.	Sprengung der Tryptophanyl- und Tyrosyl-Peptidbindung durch Bromsuccinimid	6
3.	Spaltung von Disulfidbindungen	6
a)	Oxydation	
b)	Reduktion	
4.	Spaltung von Peptidbindungen mit proteolytischen Fermenten	6
C.	DIE REDUKTIVE SPALTUNG DES γ G-GLOBULINS	6
1.	Chromatographische Auftrennung der durch Reduktion entstandenen Polypeptidketten	7
2.	Molekulargewicht	8
3.	Identifizierung der Spaltprodukte im Stärkegel	9
4.	Kohlenhydratgehalt	11
5.	N-endständige Aminosäuren	13
6.	Aminosäurenbruttoformel	14
a)	Gesamtmolekül	
b)	A und B Polypeptidketten	
7.	Disulfidbindungen	16
a)	unterschiedliches Verhalten von intra- und interchain Disulfidbindungen bei verschiedenen Proteinen	16
b)	freie Thiolgruppen des γ G-Globulins	16
c)	Totalbetrag der Disulfidbindungen	17
d)	Abgrenzung und Verhalten der interchain Disulfidbindungen	18
e)	Reoxydation der reduzierten Thiolgruppen	19
8.	Antigenetische Eigenschaften	19
a)	antigene Merkmale des γ G-Globulins	19
b)	Antigeneigenschaften der A und B Ketten	21
9.	Antikörperfunktion	23
a)	Spezifitätstheorien	23
b)	Wertigkeit des Antikörpers	23
c)	Lokalisation der Haftstellen	24
d)	Struktur der Haftstellen	24
D.	DIE ENZYMATISCHE SPALTUNG DES γ G-GLOBULINS	26
1.	Methoden	27
I a)	verwendete Seren	27
I b)	Isolierung der normalen γ G-Globuline und der Paraproteine	27
II	Papierelektrophorese	30
III	Immunoelektrophorese	30
IV	Doppeldiffusionstest nach Ouchterlony	31
V	Ultrazentrifugation	32
VI	Quantitative Eiweißbestimmung	32
VII	Enzymatische Spaltung	33

VIII. Chromatographische Auftrennung der Fragmente	35
1. Trennung der Peptide durch Gel-Filtration	35
2. Trennung der hochmolekularen Fragmente	35
a) Fraktionierung mit CM-Cellulose	36
b) Fraktionierung mit DEAE-Cellulose	37
c) Fraktionierung mit DEAE-Sephadex	37
2. Ergebnisse	39
I. Degradation von γ G-Globulin	
1. Abtrennung und Untersuchung der Peptide	39
2. Chromatographische Auftrennung mit CM-Cellulose	41
3. Chromatographische Auftrennung mit DEAE-Cellulose	42
4. Chromatographische Auftrennung mit DEAE-Sephadex A 50 Medium	43
5. Ultrazentrifugenuntersuchung	44
6. Antigenstruktur	44
II. Degradation von γ G-Paraprotein	46
1. Fälle	46
a) Fall Zo	46
b) Fall Ba	47
c) Fall Porg	48
2. Antigenstruktur	48
3. Diskussion der Methoden	50
I. Enzymatische Degradation	50
II. Trennungsmethoden	52
4. Diskussion der Ergebnisse	55
I. Normales γ G-Globulin	55
II. γ G-Paraprotein	58
5. Zusammenfassung	60
E. LITERATURVERZEICHNIS	62

A. EINLEITUNG

Bereits im Jahre 1892 entdeckten Tizzoni und Cattani, daß die Antikörper des Organismus Globuline sind, die mit den Eiweißkörpern des Blutes zirkulieren. Es dauerte jedoch weitere vier Jahrzehnte, bis sich die klinische Forschung mit dem Problem der humoralen Abwehr ebenso eingehend beschäftigte, wie sie es mit der cellulären schon längst getan hatte. Dies hatte seine Ursache wohl in zweierlei Gründen. Einerseits verband der Kliniker die humorale Abwehr „nur“ mit dem Begriff der Immunität, so daß das Interesse auf andere Probleme verlagert war. Andererseits war die Erforschung der cellulären Abwehr im wesentlichen mit klassischen Methoden wie der Mikroskopie möglich, während die Erforschung der humoralen Abwehrmechanismen biochemische Methoden voraussetzte, die erst in den letzten 20 Jahren entwickelt wurden. Im gleichen Zeitraum traten auch Fragen der Allergie und der Auto-Antikörper als Ursache von Krankheiten in den Blickpunkt des Klinikers. Mit neuen Methoden wurden auch Entgleisungen des humoralen Systems entdeckt: a) die sog. "Paraproteinämien", die Krankheitsbildern entsprechen wie Multiples Myelom, Morbus Waldenström, paraproteinämische Reticulosen und andere mit Paraproteinämie einhergehende unspezifische Krankheitsbilder. b) Defektzustände wie konnatales und erworbenes Antikörpermangelsyndrom. Die modernen Probleme der Medizin, die "Immunologische Toleranz" und die Transplantation rückten die humorale Abwehr vollends in den Blickpunkt klinischen Interesses. Um eine Antwort auf die Fragen nach Synthese und Spezifität der Antikörper, Ätiologie von Intoleranz und allergischer Reaktion - um nur einiges zu nennen - zu erhalten, ist es unumgänglich notwendig, die Struktur der Immunglobuline aufzuklären. Vorliegende Arbeit soll nun einen Versuch darstellen, aus Literatur und eigenen Untersuchungen ein dem modernen Stand der Erkenntnisse gerechtes Bild der Immunglobuline zu entwerfen. Auf Lehrbuchwissen soll weitgehend verzichtet werden.

B. MÖGLICHKEITEN DER FRAGMENTIERUNG

Von vornherein war klar, daß die Hauptschwierigkeiten, die sich der Strukturanalyse entgegenstellen, in der Größe der Proteine begründet liegen. Darüber hinaus hat man es selbst bei den isolierten Unterfraktionen der Immunglobuline nicht mit homogenen Substanzen zu tun, sondern mit einem Pool von Proteinen, die sich in verschiedenen physiko-chemischen Daten voneinander unterscheiden. Haurowitz prägte dafür den Begriff der Mikroheterogenität. Selbst hochgereinigte spezifische Antikörper, deren Isolierung heute möglich ist, zeigten unter sich noch eine solche Mikroheterogenität. Paraproteine, die sich zwar durch große Homogenität auszeichnen, hatten wiederum den Nachteil, daß sie keine Antikörperfunktion besitzen.

Ein großer Schritt vorwärts war daher die Zersplitterung hochmolekularer Eiweißmoleküle in kleinere Bruchstücke. Dazu standen verschiedene Methoden zur Verfügung.

1. Dissoziation durch Erhitzen auf 90°C.

Durch ausgedehntes Erhitzen von γ G-Globulin bei pH 9,8 wurden Produkte erhalten mit einem Sed.Koeff. $S_{20w} = 1,4S$ (Phelps et al.¹⁴)

Zwischenprodukte zwischen 1,4 S und 6 S wurden nicht beobachtet. Der Verlust immunologischer Aktivität war jedoch 100 %.

2. Sprengung der Tryptophanyl- und Tyrosyl-Peptidbindung durch Bromsuccinimid

Über die erfolgreiche Spaltung mit Bromsuccinimid war von Patchornik et al.² und Schmir et al.³ berichtet worden. γ -Globulin wurde in Bruchstücke von 5,36 S und 2,34 S gespalten. Kleinere Bruchstücke wurden nicht beobachtet. (Phelps et al.¹)

3. Spaltung von Disulfidbindungen

a) Oxydation

Durch Oxydation des γ -Globulins mit H_2O_2 und Cu^{2+} als Katalysator wurden Fragmente erhalten von $S_{20w} = 3,6$ S. Bei längerer Reaktionszeit wurde diese Komponente in noch kleinere Einheiten von 1,1 S umgewandelt. Cu^{2+} ist als Katalysator spezifisch für die Spaltung und kann nicht durch andere Metallionen ersetzt werden. Die Nützlichkeit der peroxydativen Spaltung wird jedoch herabgesetzt, da auch Aminosäuren (His, Lys, Met) stark angegriffen werden.

b) Reduktion

Durch Reduktion mit Mercaptanen oder Sulfit werden nur die Disulfidbindungen gespalten, wodurch Polypeptidketten entstehen. Damit stand eine reproduzierbare, spezifische Spaltungsmethode zur Verfügung.

4. Spaltung von Peptidbindungen mit proteolytischen Fermenten

Außer der reduktiven Methode konnten auch mit bestimmten Enzymen wie Papain, Ficin, Bromelain, Pepsin, um nur die wichtigsten zu nennen, immunologisch aktive, reproduzierbare Fragmente erhalten werden. Für unsere Untersuchungen wählten wir diese enzymatische Methode unter Verwendung des Pflanzenfermentes Papain.

Über die Ergebnisse der reduktiven und enzymatischen Spaltung der Immunglobuline soll im folgenden berichtet werden.

C. DIE REDUKTIVE SPALTUNG DES γ -GLOBULINS

1957 beschrieben Deutsch und Morton die Disaggregation von Makro-Globulinmolekülen in Fragmente von der Größe des γ -Globulins. Diese Disaggregation war durch Reduktion mit 0,1 M Mercapto-äthanol erhalten worden. 1959 konnte Edelman⁷ mit 0,1 M Mercaptoäthylamin und 6 M Harnstoff auch γ -Globulin in Untereinheiten von $S_{20w} = 2,3$ S reduzieren. Das Molekulargewicht war dadurch von 150 000 auf 48 000 abgesunken. Das Absinken des Molekulargewichts nach Behandlung mit Reduktionsmitteln wurde

auch von Franek⁶, Ramel et al⁷ und Edelman und Poulik beobachtet. Durch die Denaturierung mit Harnstoff, Guanidin oder Dodecylsulfat waren die gewonnenen Fragmente jedoch immunologisch inaktiv geworden.

Einen großen Fortschritt bedeutete es daher, als es Fleischman et al⁸ 1962 gelang, durch schonungsvolle Reduktion mit 0,75 M Merkaptoethanol ohne Verwendung denaturierender Mittel Polypeptidketten zu erhalten, die immunologisch noch aktiv waren. Damit wurden folgende Ergebnisse gewonnen:

1. Chromatographische Auftrennung der durch Reduktion entstandenen Polypeptidketten

Da durch Reduktion der Disulfidbindungen das Molekulargewicht des γ -Globulins von ungefähr 150 000 auf 50 000 und darunter absinkt und somit Fragmente des Gesamtmoleküls gewonnen werden, war es für die weiteren Untersuchungen notwendig, diese Fragmente voneinander zu trennen. Edelman und Poulik¹⁰ versuchten durch Ionenaustauscherchromatographie mit dem Kationenaustauscher Carboxymethyl - Cellulose eine Trennung zu erreichen. Es konnten zwei völlig voneinander getrennte Peaks gewonnen werden. (10,11,12) Die Wiedergewinnungsrate war 60 %. Das Material des ersten Peaks wurde durch die Cellulose nicht gebunden und erschien innerhalb des ersten Säulenvolumens. Der zweite Peak konnte nicht weiter aufgelöst werden und wurde bei Rechromatographie an derselben Stelle eluiert; ein Zeichen für echte Auftrennung. Der erste Peak enthielt 10 % des eluierten Materials, das sich in der Stärkegelelektrophorese als rein erwies. Das Molekulargewicht betrug 20 000. Während der erste Peak ziemlich rein war, zeigte sich der zweite Peak relativ heterogen. Er enthielt aggregiertes Material zusammen mit Komponenten des ersten Peaks und Komponenten mit Molekulargewicht um 100 000. Ein ähnliches Bild ergab sich, wenn γ -Globulin ohne die Gegenwart von Harnstoff reduziert wurde. (13,10,) Die Chromatographie von reduziertem Kaninchen γ -Globulin ergab ein ähnliches Bild wie das von Human γ -Globulin.

Eine wesentliche Verbesserung der Trennung brachte die Adsorptionschromatographie unter Verwendung vernetzter Dextrane. Fleischman et al¹⁴ isolierten mit Sephadex G 75 aus reduziertem Human, Pferde und Kaninchen γ -Globulin zwei Peaks. Die Wiedergewinnungsrate betrug 85 - 100 %. Das Maximum an B lag zwischen 24 - 29 %. (14,15) 73 - 75 % des aufgegebenen Materials wurden mit Peak A eluiert. (Cohen¹⁶, Porter¹⁷, Small et al¹⁸, Metzger und Singer^{14,15}) Diese Werte stimmen für verschiedene Spezies überein.

Das Material des Peak A neigte leicht zur Ausbildung von Präzipitaten, besonders wenn es vom Kaninchen γ -Globulin stammte. Durch Zugabe von gleichen Mengen B konnte das verhindert werden. (14) Durch stärkere Reduzierung konnte keine weitere Auftrennung erzielt werden.

Um die chromatographische Reinheit des von Sephadex G 75 zuerst eluierten Peak A und des danach eluierten Peak B zu überprüfen, wurde reduziertes Kaninchen γ -Globulin auf Sephadex G 200 fraktioniert. (15) Es wurden 4 Peaks eluiert, die nicht sehr scharf voneinander abgesetzt sind. Nur der letzte Peak entsprach dem Peak B der Sephadex G 75 Fraktionierung. Wurde das Experiment

mit 8 M Harnstoff 1 N Propionsäure wiederholt, dann glichen die Ergebnisse der Sephadex G 75 Fraktionierungen. Zusammen mit der Lösungsmittelfront wurde ein kleiner Peak eluiert, bei dem es sich um aggregiertes Material A handelte. Im Laufe der Arbeit wird wiederholt auf die Tendenz der A Fragmente, starke zwischenmolekulare, nichtkovalente Bindungen auszubilden, hingewiesen. Die Ausbeute an A und B Material war die gleiche wie bei Sephadex G 75. (15,16) Da durch verschiedene Methoden immer nur zwei Typen von Fragmenten isoliert werden konnten, lag es nahe, anzunehmen, daß die γ G-Globuline verschiedener Spezies aus zwei Typen von Polypeptidketten aufgebaut sind, $\frac{2}{3}$ des Moleküls aus Polypeptid Typ A und $\frac{1}{3}$ aus Polypeptid Typ B. (17,20,18,12,10,9,15,16,19,21)

2. Molekulargewichte

Die Bestimmung der genauen Molekulargewichte und Sedimentationskoeffizienten stieß von Anfang an auf große Schwierigkeiten. Edelman fand, daß die Produkte, die er gewann, in wässrigen Lösungsmitteln unlöslich waren und nur in konzentrierten Harnstofflösungen nicht sofort Aggregate bildeten. Diese Aggregation in Salzlösung oder Wasser wurde von Franek bestätigt. Edelman gibt für die reduzierten Produkte ein Molekulargewicht $M_{app} = 48\ 000$ an. Nach Franek wurde γ G-Globulin von Schwein, Rind, Pferd, Mensch und Kaninchen von 150 000 - 160 000 auf 40 000 - 45 000 reduziert. Die Werte von Edelman et al.²² betragen für reduzierte Antipikrin-Antikörper des Meerschweinchens 45 000. Ramel et al.⁷ berichten über ein Molekulargewicht des reduzierten Rinder γ G-Globulins von 30 000. Da diese Werte doch beträchtlich untereinander schwankten, waren eingehendere Untersuchungen notwendig. Vor allem mußten geeignete Lösungsmittel gefunden werden. Lösungen mit Ionenstärken über 0,2 waren ungeeignet, da Tyndalleffekt und zum Teil Niederschläge auftraten (10). Als geeignet erwiesen sich konzentrierte Harnstofflösungen (6 M oder höher), Guanidin HCl-Lösungen (5 M oder höher), 0,5 % - 1 % Na-Dodecyl Sulfatlösungen oder 50 % Essigsäure. (10) Das apparente Molekulargewicht des Human γ G-Globulins betrug 189 000 und fiel nach Zugabe von 6 M Harnstoff auf 167 000 (10). Es war schwierig zu entscheiden, ob dieser Abfall nur auf einer Dispersion von Aggregaten beruhte. Der korrigierte Sedimentationskoeffizient betrug 5,2 S_{20w}. Nach Reduktion sank das Molekulargewicht auf 48 000 - 51 000 und der Sedimentationskoeffizient auf 2,1 - 2,3 S_{20w}. (Edelman und Poulik²³)

Bessere Auftrennungen mit Sephadex G 75 (Fleischman et al.⁹) zeigten, daß die Fragmente des Peak A, die identisch sind mit dem Material des zweiten Peaks, der auf CM-Cellulose eluiert wird, in saurer und neutraler Harnstofflösung polydispers sind und aus zwei Hauptkomponenten zusammen mit etwas aggregiertem Material bestehen. Erst in 8 M Harnstoff - 0,2 M KCl - 0,1 M Ameisensäure blieb D₂₀ für A vom Pferd längere Zeit konstant. Kaninchen A Komponenten²⁴ waren selbst in dieser Lösung noch polydispers. Material des Peak B war dagegen in saurer und neutraler Harnstofflösung monodispers. Für die beobachteten Aggregationen scheint also im wesentlichen A verantwortlich zu sein.

Die Sedimentationskoeffizienten von A und B (H und L) in saurer und neutraler Harnstofflösung zeigen eine bemerkenswerte Konzentrationsabhängigkeit. (Pain 24, 44, 18) Die extrapolierten Werte betragen für A - 2,4 S₂₀^w und für B 1,8 S₂₀^w. Das Molekulargewicht war für A = 105 000^w und für B 40 000^w. (9) Harnstoff beeinflußt die Molekulargewichtsbestimmung kaum. (Kielley 25, Trautman und Crampton 26)

Fleischman vermutete, entsprechend dem Verhalten von B auf Sephadex G 75 bei verschiedenen Elutionsmitteln, daß B in einem dimeren Zustand vorliegt. Er nahm an, daß zwischen dem dimeren und dem monomeren Zustand ein Gleichgewichtszustand herrscht. Auch A scheint in einem solchen Gleichgewichtszustand vorzuliegen. (13) Diese Vermutung wurde voll bestätigt. (24, 18) Danach besitzt B bzw. L ein Molekulargewicht von 20 000 und A bzw. H ein Molekulargewicht von 50 000. Diese Einheiten sind die kleinsten, die bis jetzt durch Spaltung der Disulfidbindungen und nicht kovalenten Bindungen erhalten wurden. (15, 16, 18, 17, 24) Blumenfeld und Gallop 27 beschrieben die Spaltung von esterähnlichen Bindungen im Kollagen durch M-Hydrazin. Bei gleicher Behandlung von A und B konnte kein Einfluß auf die Molekulargröße beobachtet werden. (15) Kombiniert man die Werte dieser einzelnen Polypeptidketten A und B, so ergibt die Kombination von 2 A und 2 B das Molekulargewicht des unbehandelten γ -Globulinmoleküls. Dieser Befund gilt für verschiedene untersuchte Säuger wie Mensch, Rind, Pferd, Schwein, Kaninchen.

3. Identifizierung der Spaltprodukte im Stärkegel

Stärkegel erwies sich als hochgeeignete Trägersubstanz für die Zonenelektrophorese. Die ersten Untersuchungen darüber stammen von Edelman und Poulik 10 unter Verwendung vertikaler Stärkegelelektrophorese. Das Gel wurde mit Formattpuffer pH 2,9 - 3,8 M Harnstoff präpariert. (Poulik 30) Diese Versuchsbedingungen wurden auch von allen anderen Untersuchern angewendet. Nach Reduktion von γ -Globulin konnten statt der bekannten diffusen Bande vier Banden identifiziert werden, von denen zwei stärker gefärbt waren. (10) Die von langsamerer Beweglichkeit war scharf konturiert, die mit der schnelleren Beweglichkeit war diffus. Die Zahl der scharf konturierten Banden von langsamerer Beweglichkeit variierte etwas. Edelman und Poulik 30 konnten nur zwei scharf konturierte, schmale Banden identifizieren. Edelman et al 22 beschrieben nur eine langsame scharfe Zone beim Meerschweinchen. Bei Mensch und Pferd konnten außer einer scharfen Zone noch zwei langsamere, schwächere Zonen entdeckt werden. (9, 16, 13) Alle Untersucher konnten jedoch nur eine diffuse, schneller wandernde Zone beobachten. Nur beim Kaninchen γ -Globulin konnte diese diffuse Zone nach Reduktion kaum beobachtet werden (9, 17).

Nach Auftrennung mit Ionenaustauscher oder Adsorptionschromatographie konnten die einzelnen Zonen identifiziert werden. Die am schnellsten wandernde diffuse Zone entsprach dem zuletzt eluierten Peak von Sephadex G 75, G 100, G 200. (9, 16, 15) Die geringe Schärfe der Bande läßt auf eine reichliche Heterogenität der B-Ketten schließen. (Inzwischen durch Sequenzaufklärung bestätigt. 32) Die scharf konturierte, schmale Bande mit lang-

samerer Beweglichkeit bestand aus Polypeptidketten des Typs A (H). Die Beweglichkeit des A Materials war bei sämtlichen untersuchten Tieren gleich. Die Zonen, die langsamer als A gewandert waren, bestanden aus aggregiertem Material (10 x Monomer) oder aus nur teilweise reduziertem γ G-Globulin. (14, 16, 13)

Da die γ G-Globulinmoleküle aus A und B aufgebaut sind, und die A - Ketten immer gleiche Beweglichkeit aufweisen, lag die Frage nahe, ob die Heterogenität des γ G-Globulins nicht durch die Heterogenität der B - Ketten bedingt ist. Myelomproteine besitzen scharfe B - Banden, die sich in ihrer Lage voneinander unterscheiden. Sie lagen jedoch sämtlich im Bereich der diffusen B - Zone. Poulik und Edelman²¹ zeigten, daß durch Mischung von 19 Myelomproteinen unterschiedlicher Beweglichkeit nach Reduktion eine ähnlich diffuse B - Zone entstand. Dieser Befund läßt vermuten, daß sich die B - Ketten der voneinander verschiedenen γ G-Globuline in ihrer Aminosäuresequenz voneinander unterscheiden, da der Anteil anderer polarer Gruppen gering ist. Die Heterogenität der B - Ketten wirft außerdem die Frage auf, ob sich die Spezifität von isolierten Antikörpern der γ G-Globulinfraction nicht in einzelnen scharfen Zonen der B - Bande lokalisieren läßt.

Edelman et al.²² untersuchten das Verhalten isolierter, spezifischer Antikörper nach Reduktion und Alkylierung in der Stärkegel-Elektrophorese. Sämtliche spezifischen Antikörper enthielten langsame A - Banden mit ähnlicher Beweglichkeit wie unspezifisches γ G-Globulin. Statt der diffusen Bande des unspezifischen γ G-Globulins, die den B - Ketten entspricht, bildeten die reduzierten spezifischen Antikörper scharfe B - Banden. Reduzierte, alkylierte Anti-Dinitrophenyl-Antikörper ergaben im Bereich der diffusen Zone von B drei scharfe Banden. Anti-DNP-Antikörper verschiedener Tiere, oder aus einem Serumpool verschiedener Tiere entnommen, gaben identische Bilder. Von 8 Anti-Pikryl-Antikörpern besaßen fünf 3 B - Banden und drei 2 B - Banden. Nach Edelman, Benacerraf und Ovary²³ herrschte der Typ mit fünf B - Banden vor. Auch Anti Para-Toluolsulfonyl-Antikörper verhielten sich ähnlich. (22) Die Art des Haptenträgermoleküls wie GPA oder Ovalbumin hatte wenig Einfluß auf das Stärkegelbild. (33) Wurden dagegen dissoziierte Antikörper gegen völlig verschiedene Haptene oder Proteinantigene miteinander verglichen, so konnten Unterschiede der B - Banden beobachtet werden.

Weiter wurden Antikörper verwandter Haptene miteinander verglichen. (33) Kreuzreaktionen bilden sich aus zwischen Anti Benzoyl-Antikörpern und Anti Para-Chlorbenzoyl-Antikörpern und zwischen Anti Penta-Chlorbenzoyl-Antikörpern und Anti DNP-Antikörpern. Die ersten beiden präzipitierten jedoch nicht die Haptene (an Albumin gebunden) DNP und Penta CB.

Nach Reduktion zeigten die Anti Benzoyl-Antikörper vier B - Banden. Anti Para-Chlorbenzoyl-Antikörper besaß drei B - Banden, die identisch mit denen der Anti Benzoyl-Antikörper waren. Einzelne Anti Benzoyl-Antikörper und Anti Para-Chlorbenzoyl-Antikörper hatten ein oder zwei B - Banden gemeinsam mit Anti Pikryl-Antikörpern oder Anti Penta-CB-Antikörpern.

Es scheint also, daß sich verschiedene Antikörper in ihrer Spezifität durch unterschiedliche Anzahl und Beweglichkeit der B - Banden voneinander unterscheiden. Systeme, die Kreuzreaktionen miteinander geben, besitzen in der Regel einige identische

B - Banden. Auffällig ist jedoch, daß gegen dasselbe Antigen strukturell verschiedene Antikörper gebildet werden. Andererseits kann nicht ausgeschlossen werden, daß Antikörper mit identischen B - Banden unterschiedliche immunologische Spezifität aufweisen. Auch die Multiplizität der B - Banden in einem System läßt auf Antikörper schließen, die sich gering durch die Aminosäuresequenz der B - Ketten in ihrer Struktur voneinander unterscheiden.

4. Kohlenhydratgehalt

Die Bestimmung proteingebundener Kohlenhydrate konzentrierte sich früher im wesentlichen auf die γ -Globulinfraktion des Serums, die den höchsten Gehalt an Glykoproteiden aufweist. Erst in jüngerer Zeit wurden diesbezüglich auch eingehendere Untersuchungen mit den Immunglobulinen angestellt. Es war schon seit längerem bekannt, daß γ -Globuline proteingebundenes Kohlenhydrat besitzen. (Smith et al.³⁴, Seibert et al.³⁵, Weimer et al.³⁶) Von diesen Autoren wurden nur Hexosen bestimmt, ihre Angaben unterschieden sich jedoch noch beträchtlich voneinander. Erst Müller-Eberhard³⁷, Schultze³⁸ und Sonnet³⁹ erhielten bessere Werte. Sehr ausführlich mit der Bestimmung der γ -Globulin gebundenen Kohlenhydrate befaßte sich Knedel⁴⁰, Heide et al.⁴¹ und Müller-Eberhard⁴². Bis jetzt konnten vier Kohlenhydratkomponenten bestimmt werden: Hexosen, Hexosamine, Neuraminsäure (es handelt sich hier um Sialinsäure, eine N-Acetylneuraminsäure) und Fucose. Die Hexosen bestehen aus Galaktose und Mannose. Glukose kommt protein-gebunden nicht vor. Als Bestandteile der Hexosamine wurden Glukosamin und Galaktosamin festgestellt. Knedel⁴⁰ zeigte durch säulenchromatographische Auftrennung dieser beiden Komponenten mit Dowex x 8/200-400 mesh, daß der prozentuale Anteil des Glukosamins den des Galaktosamins bei weitem übertrifft. Neuraminsäure und Fucose, eine 6-desoxy-L-Galaktose, wurden im γ -Globulin erst in jüngerer Zeit bestimmt, obwohl ihr Vorkommen im Serum schon länger bekannt ist. (43,44,45) Die Schwankungsbreite der gefundenen Werte ist sehr gering, besonders für Sialinsäure und Fucose, sodaß man annehmen muß, daß γ -Globuline einen eindeutig definierten Gehalt an Kohlenhydraten besitzen: 1 Mol γ -Globulin enthielt 10 Mol Hexose, 10 Mol Hexosamin, 1 Mol Sialinsäure und 2 Mol Fucose. Besonderes Interesse beanspruchte die Frage, ob die Heterogenität der γ -Globuline (46,47,48,49,50) auf unterschiedlichem Aminosäuregehalt oder auf verschiedenem Gehalt an Kohlenhydraten beruht. Eine Zunahme der Beweglichkeit zur Anode könnte erklärt werden durch Zunahme des KH Gehalts. Besonders müßte die saure Komponente der Neuraminsäure ladungsfördernd wirken. Knedel stellte fest, daß in allen Zonen des γ -Globulins der Gehalt an Fucose gleich blieb. (40,41) Er schloß daraus, daß das γ -Globulin durch seinen Gehalt an Fucose weitgehend charakterisiert ist. Der Gehalt der schneller wandernden Fraktionen an Hexosen und vor allem an Sialinsäure ist dagegen deutlich erhöht. (40,41) Im langsamer wandernden Teil lagen die Werte dieser KH Komponenten niedriger als in der Gesamtfraktion. Müller-Eberhard und Kunkel⁴² konnten keine wesentliche Zu-

nahme des KH-Gehalts der schneller wandernden Zonen gegenüber den langsameren feststellen. Das Ausgangsmaterial war im Gegensatz zur Knedelschen Untersuchung Cohn Fr. II, die frei ist von Makroglobulinen. Die schnellen Zonen des papierelektrophoretisch getrennten γ -Globulins enthalten γ -M-Globulin, von dem bekannt ist, daß es einen wesentlich höheren KH-Gehalt einschließt der Fukose besitzt. (51,40,41) Durch Abzentrifugieren der schnell sedimentierenden Anteile nahm der KH-Gehalt der schneller wandernden Zonen ab.

Trotz dieser Befunde spricht doch einiges dafür, daß sich die einzelnen Zonen im KH-Gehalt voneinander unterscheiden. Schultze (zit. n. Knedel) hatte gezeigt, daß durch die Behandlung von Globulinen mit Neuraminidase eine Verlangsamung der elektrophoretischen Beweglichkeit auftritt.

Knedel konnte weiter zeigen, daß sich verschieden schnell wandernde γ -G-Paraproteine in ihrem KH-Gehalt ähnlich wie die normalen γ -G-Globuline verhalten. Paraproteine mit schnellerer Beweglichkeit wiesen einen höheren KH-Gehalt auf als solche mit langsamerer Beweglichkeit (40,42). Der Fukosegehalt bleibt bei sämtlichen Beweglichkeiten gleich, während der Sialinsäurewert ständig ansteigt. Für Hexose und Hexosamine ergeben sich keine so geordneten Beziehungen. Trotzdem sind die KH-Werte der γ -G-Paraproteine und der normalen γ -G-Globuline der gleichen elektrophoretischen Beweglichkeit fast übereinstimmend.

Rosevear und Smith² konnten mit Papain enzymatisch drei Glycopeptide abspalten, die wahrscheinlich gleichen Ursprungs sind. Der Peptidrest der drei Glycopeptide unterscheidet sich nur im Glutaminsäurerest. Die Endgruppenbestimmung des Glycopeptid I ergab: Glu - Glu - Asp - (Tyr - Glu - Asp . (CHO)); Glycopeptid III: Asp - Tyr - Glu - Asp . (CHO); Die Kohlenhydratkomponente ist über Asparaginsäure an das Peptid geknüpft.

Untersuchungen über die Lokalisation dieser Glycopeptide auf den durch Reduktion gewonnenen Polypeptidketten sind bis jetzt noch wenig durchgeführt worden. Die in der Literatur angegebenen Werte stützen sich im wesentlichen auf die Untersuchungen von Fleischman et al. (9,15), die am Kaninchen γ -G-Globulin durchgeführt wurden. Es wurden Hexosen, Hexosamine und Sialinsäure bestimmt. Fukosebestimmungen wurden nicht durchgeführt. Die Untersuchungen ergaben, daß 95 % des Kohlenhydrats auf den A - Ketten lokalisiert ist. Die B - Ketten enthalten nur ganz geringe Mengen an Kohlenhydrat. Ein Verlust an Kohlenhydrat durch Reduktion konnte nicht beobachtet werden. (10) Fleischman³ weist darauf hin, daß der niedrige Kohlenhydratbestandteil der B - Ketten bedingt sein könnte durch eine Verunreinigung durch A - Ketten.

Diese Befunde stehen ganz im Widerspruch zu der Vermutung, daß die unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeit der γ -G-Globulinmoleküle auf einen verschiedenen Gehalt an Kohlenhydrat zurückzuführen sei. Die A - Ketten, die den Hauptteil des Kohlenhydrats besitzen, hatten in allen beschriebenen Fällen annähernd gleiche Beweglichkeit, während die B - Ketten, die fast kein Kohlenhydrat aufweisen, elektrophoretisch heterogen sind und offensichtlich verantwortlich sind für die elektrophoretische Heterogenität des Gesamtmoleküls. Es scheint also, daß sich die B - Ketten in ihrer Aminosäurenstruktur voneinander unterscheiden, wie kürzlich nachgewiesen wurde. (32)

Auffallend ist weiterhin, daß die Kohlenhydratwerte des γ -Globulins fast 100 % mit der Summe der Kohlenhydratwerte von 2 Mol A + 2 Mol B übereinstimmen. Auch diese Übereinstimmung spricht dafür, daß am Aufbau eines γ -Globulinmoleküls 2 A - Ketten beteiligt sind. Eine Beziehung zwischen Antikörperspezifität und KH-Gehalt besteht nicht. (54)

5. N - e n d s t ä n d i g e A m i n o s ä u r e n

Porter⁵³ bestimmte als einer der ersten N-endständige Aminosäuren im γ -Globulin (Kaninchen). Er fand sowohl bei unspezifischem γ -Globulin und bei Anti-Ovalbumin als einzige N-endständige Gruppe Alanin, außerdem konnten vier weitere Aminosäuren der Sequenz aufgeklärt werden, sodaß sich folgendes Bild ergab: Ala - Leu - Val - Asp - und an fünfter Position Glutamin, was unabhängig von McFadden und Smith⁵⁵ bestätigt wurde. McFadden und Smith⁵⁵ fanden jedoch außer Alanin auch geringe Mengen von Asparagin und Lysin und Spuren von Valin, Leucin, Isoleucin, Serin und Threonin, sodaß sich ein wesentlich komplexeres Bild ergab.

Für Human γ -Globulin konnten unabhängig voneinander (84,85) annähernd 1 Mol N-endständige Asparaginsäure und 1 - 2 Mol N-endständige Glutaminsäure bestimmt werden. (58) Außerdem wurden 0,1 Mol Serin gefunden, das selbst in hochgereinigten Unterfraktionen von Fr.II_{1,2} und Fr.II₃ in gleicher Menge vorhanden war. In den einzelnen Unterfraktionen variierte das Verhältnis von Glutaminsäure zu Asparaginsäure zwischen 1 und 1,7, sodaß Putnam annahm, daß wenigstens zwei strukturell verschiedene Typen von γ -Globulin durch die Fraktionierung teilweise getrennt wurden. Abweichende Werte wurden mit γ -G-Paraproteinen erhalten. Putnam⁵⁶ beschrieb erstmals drei Myelomproteine, die als N-endständige Aminosäure 2 Mol Asparagin besaßen. In späteren Arbeiten konnte Putnam⁵⁹ vier Typen von Myelomproteinen beschreiben, die sich in ihren N-endständigen Aminosäuren voneinander unterscheiden: Paraproteine mit ausschließlich Asparagylrest, solche mit ausschließlich Glutamylrest, solche mit Leucylrest und solche, die Asparagin und Glutamin zu gleichen Teilen besaßen. Einzig Leucin war im normalen γ -Globulin nicht feststellbar.

Aus der Tatsache, daß es γ -G-Paraproteine gibt, die als N-endständige Aminosäuren Asparagin und Glutaminsäure in gleichem und stöchiometrischem Verhältnis besitzen, schloß Putnam auf das Vorhandensein von mindestens zwei Polypeptidketten im Gesamt-molekül. Zur elektrophoretischen Beweglichkeit konnte keine Beziehung hergestellt werden. (59) Aussagen über die Struktur und Homogenität der γ -Globuline auf Grund der Bestimmung N-endständiger Aminosäuren müssen jedoch mit großer Kritik betrachtet werden. So wurden bei verschiedenen untersuchten Säugern trotz großer struktureller Übereinstimmungen starke quantitative (und auch qualitative) Abweichungen bezüglich der N-endständigen Aminosäuren beobachtet. (58) Nach den Untersuchungen von Porter¹⁷ und McFadden und Smith³⁷ besitzen Pferd und Rind z. B. weniger als eine endständige Aminosäure. Es scheint also, daß im nativen Molekül N-endständige Aminosäuren blockiert sind. Bessere Ergebnisse wurden durch Zerstörung der Tertiärstruktur und durch Bestimmung der N-endständigen Aminosäuren

der isolierten Polypeptidketten gewonnen.

Cohen fand, daß die A - Ketten und die B - Ketten sowohl Asparagin als auch Glutamin besitzen. Die A - Ketten sind reicher an Glutamin, die B - Ketten dagegen reicher an Asparagin. Auffallend ist, daß die Wiedergewinnung von Asparagin nur 60 % betrug. Die geringen Werte von Asparagin in A und von Glutamin in B könnten durch Verunreinigungen des isolierten A - Kettenmaterials durch B und umgekehrt bedingt sein, sodaß die N-endständige Aminosäure für A Glutamin und für B Asparagin wäre. Dagegen spricht jedoch die Beobachtung, daß es γ -G-Myelomproteine gibt, die nur eine Art von N-endständiger Aminosäure besitzen. (59,56)

Während die Ergebnisse, die mit den Polypeptidketten des Human- γ -Globulins gewonnen wurden, für eine Vierkettenstruktur des γ -Globulins sprechen, brachte die Untersuchung der Polypeptidketten des Kaninchen- γ -Globulins ein völlig komplexes Ergebnis. Alanin und Asparagin waren im wesentlichen auf der B - Kette lokalisiert und lagen um ein vielfaches höher als im Nativprotein. Serin ließ sich in keiner der Ketten nachweisen. Auch bei der Bestimmung der N-endständigen Aminosäuren in den Polypeptidketten wird die Sonderstellung und die Bedeutung der A - Ketten für die Konfiguration offenbar. In den A - Ketten scheinen die N-endständigen Aminosäuren auf irgend eine Weise blockiert zu sein. Die Ausbildung einer zyklischen Form nach Reduktion ist nicht sehr wahrscheinlich: Die Ursache dürfte in der geringen Stabilisierung der A-Kettenstruktur liegen.

6. Aminosäurenbruttoformel

a) Gesamtmolekül

Heimer, Wogds⁶⁰ und Engle⁶⁰, Putnam und Hsiao⁶¹, Crumpton und Wilkinson⁶² berichteten über die Aminosäurenbruttoformeln von Human- γ -Globulin. Ähnliche Werte wurden von Fleischer et al.⁵⁴ und Smith et al.⁵³ für spezifische Kaninchen- γ -Globulinantikörper erhalten. (54) Die Aminosäurenbruttoformeln der einzelnen Antikörper unterschieden sich kaum voneinander, ebenso war der Unterschied zum Human- γ -Globulin sehr gering. Crumpton vermutet, daß diese Unterschiede keine Charakteristika der γ -Globuline einzelner Spezies sind, sondern in den unterschiedlichen Techniken der einzelnen Autoren zu suchen sind. (54,63)

Auch bei der Hydrolyse verhalten sich Human- γ -Globulin und Kaninchen- γ -Globulin identisch. Dasselbe gilt für die Hydrolyse der A - und B - Ketten. (62) So wurde bei zunehmender Hydrolysezeit eine Abnahme der Werte von Serin, Threonin und Tyrosin für beide Spezies beobachtet, wogegen Histidin und Valin zunahm. γ -Globulin beider Spezies enthielt große Mengen an Serin, Valin, Glutamin, Asparagin, Threonin, Prolin und Leucin und sehr geringe Mengen an Methionin, Histidin und Isoleucin.

Auffällig ist der geringe Gehalt an S-haltigen Aminosäuren. Cystein wurde in so geringen Mengen erhalten, daß es nicht sicher bestimmt werden konnte. (62) Bei dem unter gleichen Umständen hydrolysierten Insulin konnte es ohne weiteres bestimmt werden, sodaß dieses Phänomen seine Ursache in der besonderen Struktur des γ -Globulins hat. (62) Ein weiterer Baustein von Proteinen ist Oxylysin. Es wurde 1938 von van Slyke als Baustein der Gelatine und des Kollagens gefunden. Waldenschmidt-

Leitz et al.⁶⁴ konnten es auch in erheblichem Maße im γ -Globulin nachweisen. Geringe Mengen enthielten auch die α -Globuline. Der Anteil im Human- γ -Globulin betrug 0,85 % und im Kaninchen- γ -Globulin 0,60 %. Crumpton und Hamilton⁶² und Hamilton und Anderson⁶⁵ konnten dagegen kein Hydroxyllysine im γ -Globulin nachweisen. Andere Arbeiten über dieses Problem waren nicht bekannt. Koshland und Engleberger⁶⁶ gelang es, erstmals quantitative Unterschiede bestimmter Aminosäuren zwischen spezifischen Antikörpern zu beobachten. Hochgereinigte Antikörper gegen p-azo-benzarsinsäure hatten einen charakteristisch erhöhten Gehalt an Arginin und Isoleucin, Antikörper gegen p-azophenyltrimethylammoniumionen einen höheren Gehalt an Asparagin und Leucin. Die anderen Aminosäuren waren weitgehend gleich.

Koshland, Engleberger und Shapanka⁶⁷ konnten noch einen dritten Antikörper gegen p-amino-phenyllactosid isolieren, der höheren Asparagin- und geringeren Tyrosingehalt als Anti-Benzarsinsäure-Antikörper besaß. Auch der Seringehalt lag um 3 % niedriger.

Für diese Beobachtung stehen zwei Erklärungsmöglichkeiten zur Verfügung: 1. Die Aminosäureunterschiede stehen in Beziehung zur Spezifität des Antikörpers. Das würde eine genetische Kontrolle spezifischer Antikörperproduktion bedeuten.

2. Die Unterschiede stehen nicht in Beziehung zur Spezifität, sondern repräsentieren verschiedene γ -Globuline der Gesamtfraktion. Die erste Annahme ist jedoch wahrscheinlicher. Dafür spricht auch der Befund, daß bei Antikörpern gegen positiv geladene Antigene, die Haftstellen negativ geladene Gruppen besitzen und umgekehrt. (Grossberg und Pressman⁶⁸) Der Befund Jirgensons⁶⁹, daß γ -Globuline und Bence Jones Proteine optisch drehen, konnte von Winkler und Doty⁷⁰ nicht bestätigt werden. Außerdem ist mehr als die Hälfte des Moleküls aus Aminosäuren zusammengesetzt, die im physiologischen pH-Bereich normalerweise keine Helix bilden. (Vor allem Prolin mit 8 %) Auch Valin (112 Mol), Poly-Serin und Poly-L-Threonin formen keine stabile Helix. Außerdem gibt es genügend Disulfidbindungen, die eine gestreckte Polypeptidkette aufrechterhalten können.

b. A und B Polypeptidketten

Die Untersuchungen von Crumpton und Wilkinson⁶² ergaben, daß sich die in g% ausgedrückten Aminosäurenwerte der Polypeptidketten vom Typ A und Typ B stark ähneln. Dennoch gibt es einige charakteristische und bemerkenswerte Unterschiede zwischen den A- und den B-Ketten. So enthält die B-Kette des Human- γ -Globulins mehr Alanin und Arginin als die A-Kette. Die A-Kette enthält dafür mehr Histidin, Prolin, Tyrosin, Tryptophan und Methionin. Die Unterschiede betragen mindestens 30 %.

Ähnliche Befunde lassen sich auch beim Vergleich der A- und B-Ketten vom Kaninchen- γ -Globulin feststellen. B enthält mehr Tyrosin (30 %) als A und A enthält mehr Histidin, Prolin, Tyrosin, Tryptophan, Methionin und Arginin. Neben diesen Befunden sind auch die relativen Werte der Aminosäuren der Analogen Ketten des Human- und Kaninchen- γ -Globulins sehr ähnlich. Der einzige bedeutendere Unterschied liegt in dem höheren Arginengehalt der B-Kette vom Kaninchen gegenüber der B-Kette von

Mensch und Pferd. Wie berichtet wird, konnte Kaninchen- γ G-Globulin in zwei gleich große Teile gespalten werden. (71,72) Die Aminosäurenbruttoformel beider Hälften ergab völlig identische Werte. Durch die Reduktion wurden also zwei identische Teile gewonnen, die jeweils aus einer Kette A und einer Kette B zusammengesetzt sein müssen. Untersuchungen über den Aminosäuregehalt der Polypeptidketten spezifischer Antikörper sind bis jetzt nicht bekannt. Die Vierkettentheorie Fleischmans⁷⁴ wird durch die Aufstellung der Aminosäurenbruttoformel weiter unterstützt.

7. Disulfidbindungen

a) Unterschiedliches Verhalten von intra- und interchain Disulfidbindungen bei verschiedenen Proteinen

Es gibt eine Reihe von Beispielen, daß die Reaktionsfähigkeit der in einem Proteinemolekül verteilten Disulfidbindungen stark variiert. Alexander⁷⁵ berichtet, daß $2/3$ der Disulfidbindungen der Wolle völlig resistent sind gegen Oxydation mit Hypochlorit oder Permanganat, jedoch durch Peressigsäure restlos oxydiert werden. Denaturierung hatte keinen Einfluß auf die Reaktionsfähigkeit. Bei Albumin dagegen ist die Oxydierbarkeit mit Peressigsäure sehr gering und steigt erst nach Denaturierung mit Guanidin auf 100 %. (73) Auch die Reduzierbarkeit einzelner Disulfidbindungen im Albumin ist unterschiedlich (74,75). Da die Oxydation mit Peressigsäure, die unabhängig vom Redoxpotential der Disulfidbindungen ist, nicht alle Disulfidbindungen erfaßte, macht Alexander einen sterischen Faktor für dieses Verhalten verantwortlich.

Cecil und Wake⁷⁶ untersuchten am Beispiel des Insulins die Reaktionsfähigkeit der inter- und intrachain S-S-Bindungen. Insulin besteht aus einer Kette A und einer Kette B, die durch zwei Disulfidbindungen zusammengehalten werden. Eine dritte Disulfidbindung liegt intrachain. Bei Behandlung mit Sulfid in neutraler Lösung kommt es zu einer Spaltung der Interchain Disulfidbindungen, während die Intrachain Disulfidbindung nicht beeinflußt wird. Nach Zugabe von Harnstoff oder Guanidin kann auch die Intrachain-Disulfidbindung gespalten werden. Es scheint also, daß diese S-S-Bindung, durch die der 6 - 11 intrachain Ring bedingt ist, durch Wasserstoffbindungen oder andere nichtkovalente Bindungen stabilisiert wird. Zu betonen ist noch, daß die Stabilität des intrachain Ringes durch seine Größe nicht beeinflußt wird.

Ebenso verhalten sich die intrachain S-S-Bindungen der Ribonuklease und Lysozyme. (76) Durch Reformation dieser S-S-Bindungen entsteht das Protein in alter Form. Die Intrachain S-S-Bindungen sind also bei verschiedenen Proteinen stärker stabilisiert als die Interchain S-S-Bindungen.

b) Freie Thiolgruppen des γ G-Globulins

Durch amperometrische Titration (78,79) freier Thiolgruppen des Kaninchen- γ G-Globulins konnte ein Maximum von 2,29 Mol SH Gruppen/Mol γ G-Globulin bestimmt werden. (77) Reagentien wie PCMB, die besonders SH spezifisch sind, konnten die Silberaufnahme nur um 0,5 Mol herabsetzen. Bei höherer PCMB Konzentration in Gegenwart von 6M Harnstoff verringerte sich die Silber-

aufnahme nur um etwa 1 Mol. Jodacetamid und Harnstoff können die Reaktionsfähigkeit der freien SH-Gruppen also kaum verringern. Interessant ist daher, daß dagegen durch Behandlung mit SH unspezifischen Reagentien wie Diazoacetamid oder Essigsäureanhydrid die Silberaufnahme rapide verringert wird. 30 % Veresterung der Karboxylgruppen mit Diazoacetamid blockierte 0,7 Mol und 100 % Acetylierung der Aminogruppen durch Essigsäureanhydrid blockierte 1,8 Mol SH Gruppen. Die Oxydation mit Jod (80) blockiert denselben Betrag an freien SH Gruppen. Auch Palmer und N sonoff ⁷⁴ berichten, daß die Zugabe von 0,1 M Jodacetamid den mit PCMB titrierbaren Betrag an freien SH Gruppen nur von 0,8 auf 0,5 Mol herabsetzt. Poulik und Edelman fanden für Human- γ -Globulin rund 0,9 Mol freie SH Gruppen. Annähernd derselbe Betrag wurde auch mit Rinder- γ -Globulin erhalten. (74)

c) Totalbetrag der Disulfidbindungen

Durch Reduktion mit Merkaptäthylamin in neutraler Lösung wurden im Kaninchen- γ -Globulin 7 Disulfidbindungen (77), im Human- γ -Globulinmolekül 5 Disulfidbindungen gespalten. (14,15,16)

Nach Zugabe von denaturierenden Mitteln wie Harnstoff und Guanidin erhöhte sich die Zahl der gespaltenen Disulfidbindungen bei Kaninchen- γ -Globulin auf 21,5 (77), bei Rinder- γ -Globulin auf 17,0 (74) und bei Human- γ -Globulin auf 9 (Edelman ⁷⁵). Es scheint also, daß ein Maximum von 6 - 7 Disulfidbindungen der Reduktion leicht zugänglich ist, während die restlichen Disulfidbindungen erst nach ausgiebiger Denaturierung gespalten werden.

Katchalsi et al. ⁷⁵ untersuchten am Rinder- γ -Globulin den Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf die Spaltbarkeit der Disulfidbindungen. Zwischen pH 3,5 und pH 5 wurde nur eine Thiolgruppe freigesetzt. Zwischen pH 5 und pH 10 nahm die Zahl der freigesetzten SH-Gruppen fast linear zu bis auf 20 - 22 SH-Gruppen bei pH 10. Es zeigt sich also, daß in dem Bereich, in dem die γ -Globuline die geringste Netzladung aufweisen, am wenigsten Disulfidbindungen der Reduktion zur Verfügung stehen. Bemerkenswert ist jedoch, daß im sauren Bereich die Zahl der freigesetzten SH-Gruppen im Gegensatz zum Albumin nieder und konstant blieb.

Der Gesamtgehalt des Kaninchen- γ -Globulins an anionischen Gruppen beträgt 123 Mol und an kationischen Gruppen 134 Mol. (63) Man müßte also annehmen, daß im sauren und im basischen Bereich die Zahl der reduzierten Disulfidbindungen gleich zunimmt. Dafür, daß im sauren Bereich eine Entfaltung auftritt, spricht die Beobachtung von Markus und Karush ⁷⁶, daß nach Ansäuerung auf pH 3 die optische Aktivität zunahm. Wurde anschließend der pH auf 5 erhöht, so blieb eine irreversible Änderung von 12 % zurück. Durch Reduktion mit MEA wurden bei pH 3 ohne Detergentien ein Maximum von 5 Disulfidbindungen gespalten. Nach Neutralisierung betrug die irreversible Änderung 62 %. Durch Reduktion bei pH 5 änderte sich mit ansteigender MEA-Konzentration die optische Aktivität und die Viskosität nicht, obwohl die Zahl der gespaltenen Disulfidbindungen 5 - 6 betrug.

Es ist auffällig, daß sich die Desorganisation des γ -Globulinmoleküls nach Entfernung des desorganisierenden Mittels fast völlig zurückbilden kann, solange ein Maximum von 5 sehr sensiblen Disulfidbindungen intakt ist. Die Brechung von

zusätzlichen 12 Disulfidbindungen scheint wenig Einfluß auf die Struktur des Moleküls zu besitzen.

Es scheint, daß die Beobachtung von Cecil und Wake ⁷⁶, daß Interchain Disulfidbindungen leichter gespalten werden, auch auf das γ -Globulinmolekül zutrifft. Das heißt aber, daß die Stabilität der Sekundärstruktur abhängig von der Integrität der Tertiärstruktur ist, da bei Intaktheit der letzteren eine Desorganisation reversibel ist.

d) Abgrenzung und Verhalten der Interchain Disulfidbindungen
Fleischman ^{14,15} und Cohen ⁶³ berichten, daß durch Spaltung von maximal 5 Disulfidbindungen pro γ -Globulinmolekül 4 Polypeptidketten frei werden. Palmer, Nisonoff und van Holde ⁷² konnten die Reaktivität der Interchain Disulfidbindungen noch gegeneinander abgrenzen. Es gelang ihnen durch Reduktion mit 0,1 M MEA und anschließender Ansäuerung auf pH 2,5 - 3,3 das Kaninchen- γ -Globulin in zwei gleichgroße, identische Hälften zu teilen vom Molekulargewicht 80 000, sodaß beide Hälften aus A und B bestanden. Durch die Spaltung von 2 - 3 Disulfidbindungen wurden 2 A - Ketten getrennt. Die Komponenten konnten sich nach Neutralisieren wieder assoziieren.
Eingehendere Untersuchungen über die Zahl der Disulfidbindungen, die die beiden A - Ketten zusammenhalten, stammen von Palmer und Nisonoff ⁷¹. Nach Vorbehandlung mit Jodacetamid wurde unter ansteigender MEA-Konzentration bei pH 2,5 reduziert. Bei einer MEA-Konzentration von 0,02 M war rund 66 % des Ausgangsmaterials reduziert. Dabei wurden 1,6 SH-Gruppen freigesetzt. Dies entspricht einer Freisetzung von 2,4 (1,6/0,66) SH-Gruppen pro dissoziiertem Molekül. Durch Steigerung der MEA-Konzentration auf 0,03 - 0,1 M wurden im Durchschnitt 2,5 - 3 Disulfidbindungen gespalten. Palmer nimmt an, daß es sich bei den zwei Disulfidbindungen, die erst bei höherer MEA-Konzentration gespalten werden, um intrachain Bindungen handelt.
Durch Reduktion mit höheren MEA-Konzentrationen konnten auch die beiden Disulfidbindungen gespalten werden, die die B - Ketten an die A - Ketten binden. Dieser Befund dürfte auch auf Human- γ -Globulin zutreffen.
Dafür, daß die beiden univalenten Hälften des γ -Globulinmoleküls nur durch eine Disulfidbindung verbunden sind, sprechen auch Untersuchungen, in denen die Reduktion mit einer enzymatischen Spaltung mit Pepsin kombiniert wurde. Wurde Kaninchen- γ -Globulin bei pH 4,5 mit Pepsin behandelt, so wurde eine inaktive Komponente abgespalten, die bis jetzt noch nicht weiter analysiert wurde. (81,82,83,84,85,86,87) Das Molekulargewicht sank auf 106 000. Wurde anschließend bei pH 8 reduziert, so entstanden Fragmente mit Molekulargewicht 56 000, die sich völlig identisch verhielten. (82,84,88) Aminosäureanalyse ergab, daß diese 3,5 S Fragmente der Fraktion I bzw. II Porters (siehe später) sehr ähnlich waren, sodaß man annehmen darf, daß diese Fragmente mit den durch Reduktion und Ansäuern gewonnenen halben γ -Globulinmolekülen identisch sind. (83)
Nisonoff, Markus und Wissler ⁸⁴ beobachteten, daß die nach Proteolyse durch Reduktion gewonnenen Fragmente nur durch eine Disulfidbindung zusammengehalten wurden. Mandy und Nisonoff ⁸⁶ fanden, daß 2,5 - 2,6 SH-Gruppen frei wurden. Mit 0,5 - M - MEA wurden 6 zusätzliche Disulfidbindungen gespalten, was jedoch keinen Einfluß auf die immunologischen und physikalisch-

chemischen Eigenschaften des Fragments hatte.

Auch die Befunde von Palmer und Nisonoff⁸⁷ unterstützen die These, daß die A - Ketten nur durch eine Disulfidbindung zusammengehalten werden und lassen eine höhere Zahl als sehr unwahrscheinlich gelten. Die oben genannten Befunde bestätigen ebenfalls, daß diese eine Disulfidbindung sehr labil ist.

e. Reoxydation der reduzierten Thiolgruppen

Die Arbeitsgruppe um Nisonoff prüfte die Rückbildungsfähigkeit der reduzierten 5 S Fragmente und fand, daß bei der Passage der 5,5 S Fragmente durch das Kationenaustauscherharz IR 120 oder durch Behandlung mit organischen Quecksilberverbindungen eine teilweise Rückbildung zu 5 S Fragmenten stattfand. Durch Reoxydation mit Sauerstoff wurden 70 - 75 % umgewandelt in Komponenten mit $S_{20w} = 4,7 - 4,8$. (87,83,86,85) Die Bildung von höheren polymeren Verbindungen wurde nicht beobachtet. (83,86) Übereinstimmend wird berichtet, daß diese durch Rekombination gebildeten Körper wieder bivalent waren.

Auch Nisonoff et al.⁹² berichteten, daß die aus A und B bestehenden halben γ G-Globulinmoleküle sich nach Neutralisieren zum größten Teil wieder in das unreduzierte Ausgangsmaterial umgewandelt hatten. Da die SH-Gruppen inaktiviert waren, mußte man annehmen, daß nichtkovalente Bindungen so stark waren, daß sie die beiden Hälften zusammenhalten konnten. Nisonoff und Palmer⁸⁹ beobachteten, daß mehr als 90 % des reduzierten Proteins sich nach Neutralisieren in eine 6 S Komponente umwandeln. Ein geringer Anteil von 4 S Komponenten und etwas schneller sedimentierendem Material wurde gewöhnlich beobachtet. Der größte Teil (90 %) kann durch Ansäuern auf pH 2,4 wieder redissoziiert werden in halbe Moleküle.

Diese Rekombination ist rein zufällig; das Präzipitationsvermögen wird wieder gewonnen. (89,90,91)

Dafür, daß nichtkovalente Bindungen die halben Moleküle zusammenhalten, spricht auch die Beobachtung, daß die A - Ketten bei neutralem pH spontan aggregieren. (14,15,24)

Nach neueren Befunden (92) können auch die A und B Ketten assoziieren. Die Polypeptidketten wurden in 0,5 M Propionsäure gemischt und formten bei Dialyse gegen neutralen Puffer 30 % Material mit einem Sed.Koeff. = 6 - 7 S_{20w} und einem Molekulargewicht von 160 000. Die Antigenstruktur⁹⁰ und das elektrophoretische Verhalten war wie die des unveränderten γ G-Globulinmoleküls. Die Ketten wurden im richtigen Verhältnis assoziiert. Die rekonstruierten Moleküle konnten mit Papain in S und F Fragmente gespalten werden. Volle Antikörperaktivität wurde rekonstruiert. Durch die Rekonstruktion wurden auch hybride Moleküle geformt, die auf eine zufällige Aneinanderlagerung der A - und B - Ketten hinweisen. (90,91,89,93)

8. Antigenetische Eigenschaften

a) Antigene Merkmale des γ G-Globulins

Das Prinzip des Antigens ist die Fähigkeit, einen Organismus zu sensibilisieren und mit dem homologen Antikörper zu reagieren. Für die Sensibilisierung ist die makromolekulare Struktur verantwortlich, für die Spezifität jedoch nur die Summe der determinanten Gruppen, deren kleinste Einheit das Hapten ist. Dies ist

ein Oligopeptid, bestehend aus wenigen Aminosäuren. Die Sequenz dieser Aminosäuren scheint spezifitätsbestimmend zu sein. (94,95) Antigen wirksam sind außer Proteinen auch Lipide (96) und Polysaccharide. (97)

Zwischen der Antigenspezifität und der Antikörperspezifität der γ G-Globuline konnte kein Zusammenhang gefunden werden. (98) γ G-Globuline wurden lange nicht beobachtet. (99,100) In den letzten Jahren wurden bei Immunglobulinen genetische Unterschiede beschrieben (101,102,103,104), für die Oudin den Begriff Allotypie prägte.

Wurden Rh+ Erythrocyten mit inkompletten Anti-Rh-Antikörpern beladen, so konnte bei Zugabe bestimmter Rheumaseren Agglutination beobachtet werden. Diese Reaktion wurde durch manche Normalseren gehemmt, durch andere nicht. Die Hemmfähigkeit dieser Seren war genetisch determiniert. Der Träger dieses Hemmstoffes war Gm(a+). Weitere bekannte Erbfaktoren sind Gm(b) und Gm(x) und Gm(r). (105)

Da Gm(a) und Gm(b) durch allele Gene in ihrer Ausbildung bestimmt werden, sind alle Seren, die Gm(a+) sind, Gm(b-) und umgekehrt. Die Gene Gm(x) und Gm(r) sind Allele zu Gm(a).

Ein weiterer Antigenfaktor InV, der völlig unabhängig von dem Gm-System vererbt wird, wurde von Ropartz et al. 1966 entdeckt. Dem Gen InV(a) konnte ein Allel InV(b) zugeordnet werden. (107)

Von Fahey und Lawler 1968 konnte einwandfrei festgestellt werden, daß die Gm-Faktoren charakteristisch auf das γ G-Globulin beschränkt sind. Die anderen Immunglobuline γ A und γ M enthalten keine Gm-Faktoren. Genau so verhalten sich die entsprechenden Paraproteine.

Im Gegensatz zum Gm-Faktor sind die InV-Faktoren auch auf den Immunglobulinen γ A und γ M vorhanden. (109) Auch in Bence Jones Proteinen Typ B konnten InV - Determinanten beschrieben werden. A und B konnte nachgewiesen werden, daß die B-Ketten der γ G-Globuline und der γ M-Globuline Träger der InV-Faktoren sind. (16)

Die A - Ketten der normalen γ G- und γ M-Globuline tragen typenspezifische Antigen determinanten. Die A - Ketten der γ G-Globuline sind Träger der Gm-Aktivität. (16) InV-Faktoren konnten auf ihnen nicht entdeckt werden, genauso wenig wie Gm-Faktoren auf den B - Ketten. (111) Interessant ist noch, daß durch die Vererbbarkeit verschiedener Antigen determinanten auf den γ G-Globulinen im Organismus von Kleinkindern Antikörperbildung induziert werden kann, wenn das entsprechende allotypische Gen nicht vorhanden ist. (112) Dies steht im Widerspruch zur Clonalselektionstheorie von Burnet.

Außer der allotypischen Unterscheidung von Antigen determinanten konnten in den letzten Jahren auch antigenetische Typen auf Grund von Präzipitationsphänomenen unterschieden werden. So konnte Edelman et al. 1955 mit bestimmten Antiseren eine Doppelung der Präzipitationslinie bei der Immunelektrophorese beobachten, die kein Artefakt zu sein schien. Myelomproteine konnten schon vorher durch Korngold und Lipari (114,115) in Gruppen differenziert werden und zwar mit spezifischen Antigen determinanten. In diese Typisierung paßten sich auch die Bence Jones Proteine ein. Später konnten Mannik und Kunkel 1968 γ G- und γ A-Myelomproteine, Waldenström Makroglobuline und Bence Jones Proteine in Antigen gruppen Typ I und Typ II trennen

Antiseren gegen Antigen Typ I reagieren nicht mit Proteinen vom Typ II und umgekehrt (117). Die Verteilung auf den pathologischen Immunglobulinen ließ vermuten, daß diese Typisierung der Determinanten auch auf das normale γ G-Globulin zutrifft. Mannik und Kunkel fanden auch, daß 60 % des normalen γ G-Globulins Antigen determinanten vom Typ I und 30 % der γ G-Globuline Antigen determinanten vom Typ II besitzen. Es konnte auch klar bewiesen werden, daß die Determinanten nicht auf demselben Molekül lokalisiert sind. (118) Sie ergeben keine Kreuzreaktion miteinander. (119, 120, 11) Die Träger der Antigentypen waren im Zonelektrophoresebereich der γ G-Globuline gleichmäßig verteilt, sodaß kein Zusammenhang zwischen Antigen determinantentyp und elektrophoretischer Beweglichkeit hergestellt werden konnte. (118, 119) Da mit Anti Bence-Jones Typ I - Antikörper in manchen Fällen ebenfalls eine Verdoppelung der Präzipitationslinie beobachtet werden konnte, wurde auf das Vorhandensein weiterer Antigen determinanten geschlossen. (118) Mit Rhesusaffen-Anti-Human Antiserum gelang es Dray¹²¹, 3 Typen von γ G-Globulin zu identifizieren. Eine dritte Antigen determinantengruppe wurde auch von Burtin¹²² beschrieben.

b) Antigeneigenschaften der A - und B - Ketten

In sämtlichen Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß auf den A (H) - Ketten und auf den B (L) - Ketten nicht identische Antigen determinanten lokalisiert sind, die bei Verwendung von Anti- γ G-Globulin Antiserum keine Identitätsreaktion zeigten. (16, 11, 120) Spezifisches Anti-A(B)-Antiserum gibt keine Präzipitation mit B (A). (11)

Cohen beobachtete, daß die B - Ketten, die von normalem γ G-Globulin gewonnen wurden, bei Verwendung von Anti- γ G-Antiserum mit den Bence Jones Proteinen vom Typ I und II Identitätsreaktionen ergaben. Er schloß daraus, daß in den B - Ketten beide Determinantengruppen vorhanden sein müssen, da die A - Ketten ja mit Bence Jones keine Identität ergeben. (11) Eingehend wurde dieses Problem von Fahey untersucht. Die Immunglobuline γ M, γ A und γ G ebenso wie die entsprechenden Paraproteine besitzen eine Teilidentität, die auf gemeinsame Antigen determinanten schließen läßt. (123, 124, 125) Das gleiche gilt für Bence Jones Proteine. Fahey¹²⁰, Olin¹²⁷ und Edelman¹¹, Cohen¹⁸, Franklin¹²⁶, Schwartz und Edelman¹²⁷ und andere (siehe später) konnten zeigen, daß Bence Jones Proteine große Ähnlichkeit mit den B - Ketten der Immunglobuline, vor allem in Bezug auf ihre Antigen determinanten haben, sodaß sie zur Identifizierung der Antigen determinanten auf den Polypeptidketten wegen ihrer großen Homogenität sehr gut herangezogen werden können.

Fahey¹²⁰ fand, daß die B (L) - Ketten der γ G-Paraproteine, wenn diese vom Typ I waren, nur Typ I entsprachen. Dasselbe gilt auch für Typ II. Alle Antigen determinanten, die diese Typisierung erlauben, sind auf den B - Ketten lokalisiert. Auch in Präzipitationsversuchen beeinflussen die B - Ketten vom Typ I nicht die Präzipitation der B - Ketten Typ II mit dem homologen Antiserum und umgekehrt. Außerdem waren die B - Ketten determinanten vom Typ I (II) in allen untersuchten Fällen unter sich gleich. Die B - Ketten von normalem γ G-Globulin formten zwei Präzipitationslinien im Agar, die auch den einzelnen Antigen-

typen zugeordnet werden konnten. 60 % der B - Ketten waren vom Typ I und 30 % vom Typ II. Daß beide Antigendeterminantentypen auf einem γ -Globulinmolekül vorkommen, daß dieses also zwei Typen von B - Ketten besitzen kann, ist nach den Befunden von Mannik und Kunkel¹¹⁸ und nach Vergleichen mit Paraproteinen unwahrscheinlich.

Da die Bence Jones Proteine mit Antikörpern Präzipitate bilden, war anzunehmen, daß das Antigen mindestens bivalent ist. Das könnte dadurch möglich sein, daß das Bence Jones Protein aus zwei B - Ketten bestünde, (126) von denen jede eine Antigendeterminante trägt. Durch Reduktion wurden zwar Komponenten mit $S_{20w} = 0,7 - 1,0$ erhalten, die jedoch völlig inaktiv waren. Die Vermutung, daß die B - Ketten antigenetisch univalent sind, war dadurch aufgetaucht, daß einige spezifische Anti Bence Jones - Antikörper mit dem Papain S Fragment, das die B - Kette und Teile der A - Kette besitzt, kein Präzipitat mehr bildeten. Das intakte γ -Globulin, das zwei B - Ketten im Molekularverband hat, könnte deshalb ein Präzipitat bilden. Auch isolierte B - Ketten wären dazu in der Lage, da ja von ihnen bekannt ist, daß sie zur Ausbildung von Dimeren neigen. Eine andere Möglichkeit wäre die, daß die B - Kette zwar antigenetisch bivalent ist, daß jedoch Determinanten durch die Anwesenheit von A - Ketten oder Teilen davon, blockiert werden. Daß eine solche Blockierung stattfinden könnte, war aus mehreren Beobachtungen hervorgegangen. So beschrieb Fahey¹²⁰, daß Bence Jones Proteine bei Präzipitation mit Anti Bence Jones Antikörpern vier mal so aktiv als γ -Globuline waren. Außerdem wurde von Franklin beobachtet, daß Bence Jones Protein bei Vergleich mit γ -Globulin im Ouchterlony-Test bei Verwendung von spezifischem Anti Bence Jones Antiserum einen Sporn bildete, der bei Vergleich mit der entsprechenden B - Kette nicht vorhanden war.

Epstein et al.¹²⁸, die die Blockierung von Antigendeterminanten eingehender untersuchten, fanden, daß von Anti Bence Jones Antikörpern, die von 6 verschiedenen Kaninchen gewonnen wurden, vier mit normalem γ -Globulin nicht reagierten und nur 2 eine schwache Reaktion gaben. Wurde Antiserum gegen Bence Jones Protein Typ I und Typ II zu gleichen Teilen gemischt, so bildeten sich im Ouchterlonytest mit γ -G B - Ketten und mit Bence Jones Typ I und II je zwei Linien aus, von denen die einander entsprechenden miteinander fusierte. Mit γ -G, 5 S Pepsin-Fragment und reduziertem Pepsinfragment reagierte das Antiserum nicht. Dasselbe Verhalten wurde auch mit spezifischem Anti-B (L) - Ketten Antiserum beobachtet. Die beiden Antiseren, die auch mit normalem γ -Globulin reagieren, tun dies auch mit 5 S Fragment (3,5 s), B und BJ. Absorption dieser Antiseren mit γ -Globulin läßt zwar die Reaktion mit γ -G, 5 S und 3,5 S verschwinden, nicht jedoch mit B und BJ. Da sich BJ-Proteine und B - Ketten genauso verhalten, muß man annehmen, daß durch die Bindung der B - Ketten an die A - Ketten Antigendeterminanten auf den B - Ketten durch molekulare Konfigurationen blockiert werden. Dieser Befund war auch von Stein et al.¹²⁹ und Nachman und Engle¹³⁰ erhärtet worden.

In jüngster Zeit konnten von Ballieux auch 2 Populationen von A - Ketten, die sich in ihren Determinanten unterscheiden, festgestellt werden. Die Unterscheidung zweier Klassen von A - Ketten war durch die Verwendung von Antiseren möglich, die gegen besondere Paraproteine gerichtet sind, die erst kürzlich durch

Franklin et al. ¹³¹ und Osserman et al. ¹³² isoliert werden konnten. Diese Paraproteine sind mit den A - Ketten verwandt, unterscheiden sich aber völlig von den B - Ketten bzw. den Bence Jones Proteinen. Mit diesen Antiseren konnte Ballieux et al. ¹³³ in den normalen und pathologischen γ -Globulinen zwei antigenetisch völlig verschiedene Typen unterscheiden. Diese Unterschiede sind in den A (H) - Ketten zu suchen. Damit wäre ein Analogon zu den B - Ketten geschaffen.

A n t i k ö r p e r f u n k t i o n

a) Spezifitätstheorien

Über den Erwerb der Antikörperspezifität gibt es eine Reihe von Theorien, die jedoch weitgehend spekulativer Natur sind. Dabei geht es um zwei grundlegende Hypothesen: a) Die Primärstruktur sämtlicher Antikörper ist gleich. Es gibt nur Unterschiede der Sekundär- oder Tertiärstruktur der Antikörperhaftstellen. (induktive Theorie) b) Die Struktur des Antikörpers ist genetisch determiniert. Die Stammzellen einer Reinkultur, sog. Clonus, hyperplasieren und sezernieren spezifische Antikörper. Aus der genetischen Determination der Struktur ist zu schließen, daß sich Antikörper verschiedener Spezifität in ihrer Primärstruktur unterscheiden. (selektive Theorie) (134,135)

b) Wertigkeit des Antikörpers

Nach der Definition von Linus Pauling ¹³⁶ ist ein Antikörper ein Molekül mit einer Konfiguration, die komplementär zu einem Teil des Antigenmoleküls ist. Zur Ausbildung von Antikörper-Antigenkomplexen forderte er mindestens zwei solcher komplementären Stellen auf einem Antikörpermolekül, sofern jedes Antigenmolekül nur mit je einer Valenz an einem Antikörpermolekül befestigt ist. Pauling et al. ¹³⁷ konnten die Bivalenz experimentell bestätigen. Die Bivalenz wurde von Eisen und Karush ¹³⁸ und Carsten und Eisen ¹³⁹ zu 2 bzw. 2,5 Haftstellen/ γ -Molekül bestimmt. Auch bei Verwendung von Vollantigen betrug das Verhältnis von Antikörper/Antigen = 1/2. (140,141,142) Daß die Antikörper bivalent sind, konnte einwandfrei durch die Reduktion in Polypeptide bewiesen werden. Wurde das Pepsinfragment 5 S, das noch die volle Fähigkeit zu präzipitieren besitzt, und folglich noch bivalent sein muß, durch Reduktion der Disulfidbindungen in 3,5 S Einheiten gespalten, so ging das Präzipitationsvermögen verloren. Diese Fragmente besaßen jedoch noch die Eigenschaft, die Reaktion mit einem Vollantikörper zu hemmen und mußten folglich univalent sein. (81,82,83,84, 85,86,87,88) Durch Oxydation der durch die Spaltung entstandenen Thiolgruppen konnten wieder bivalente Antikörper geformt werden, die volle Antikörperpotenz besaßen. (83,87,86,85) Auch durch die Halbierung der Antikörpermoleküle (71,72) konnten univalente Bruchstücke gewonnen werden. Auf einem Antikörpermolekül sind also zwei identische Antikörperhaftstellen lokalisiert.

Das würde bedeuten, daß die Antikörperhaftstelle auf einer Polypeptidkette A oder B sitzt, oder je eine A - und B - Kette eine Antikörperhaftstelle ausbilden.

c) Lokalisation der Haftstellen

Fleischman et al.¹⁵ fanden, daß die Haftstellen auf den A - Ketten liegen. So konnten sie beobachten, daß A bei Zugabe zu dem Antikörper, aus dem es isoliert worden war, eine bedeutende Verzögerung der Präzipitationszeit verursachte, wenn es vor dem komplementären Antigen zugegeben wurde. B besaß keinen derartigen Effekt. Die hemmende Wirkung von A betrug 100 %, während sie bei B 0 % war.

Mit einer anderen Methode konnten Roholt et al.¹⁴³ den völlig umgekehrten Befund beschreiben. Sie fanden, daß die Haftstelle für das Hapten p-azobenzarsonat auf der B - Kette liegt. Der Methode lag der Befund Singers¹⁴⁴ zugrunde, daß intensive Jo-dierung die Antikörperhaftstellen inaktiviert.

Daß die B - Ketten an der Ausbildung der Antikörperhaftstellen beteiligt sind, beweist auch die Spezifität der B - Banden in der Stärkegelelektrophorese. Antikörper gegen völlig struktural verschiedene Haptene besaßen individuelle, scharfe B - Banden. (22,33) Auch B - Ketten, die von spezifischen Antikörpern vom Menschen gewonnen wurden, zeigten spezifische scharfe L - Banden. L - Bande von Antidextran Antikörpern waren scharf konturiert im Gegensatz zu den B - Banden, die von Antikörpern gegen kleinere Oligosaccharide gewonnen wurden. Diese waren diffuser und zeigten noch eine langsamere B - Zone. Auch Antikörper gegen Teicho-Säuren zeigten eine scharfe B - Zone. Die A - Bande war in allen Fällen identisch. (145)

Von Edelman et al.²¹ wurde zur Lokalisationsbestimmung die sehr empfindliche Phagenneutralisationsmethode herangezogen. Hier zeigte B (L) f_1 sehr geringe oder gar keine Neutralisationsaktivität, während A (H) f_1 mehr Aktivität besaß. Auch dieser Befund würde die Haftstellen in die A - Ketten verlegen. Auffällig ist jedoch, daß die Mischung beider Ketten die Aktivität um das vierfache steigerte. Hybride Mischungen von A (f_1) und B (f_2) brachten ein Ansteigen der Präzipitationsaktivität mit f_1 - Phagen um das doppelte, gegenüber einem fünffachen Ansteigen mit dem homologen Gemisch. Die hybride Mischung war jedoch inaktiv gegen f_2 - Phagen. In wenigen Fällen konnten auch unspezifische A - oder B - Ketten eine geringe Neutralisierung bewirken. Auch nach den Untersuchungen von Metzger und Singer⁸²⁹ besitzt die A - Kette die meiste Aktivität, während die B - Kette nur geringe Aktivität besitzt.

Die Erhöhung der Aktivität durch Mischung der A - und B - Ketten weist darauf hin, daß für das optimale Funktionieren der Antikörperhaftstellen eine Wechselbeziehung zwischen A und B - Ketten verantwortlich ist. Eine Erhöhung tritt auch auf, wenn unspezifische B - Ketten mit spezifischen A - Ketten gemischt werden, jedoch nicht umgekehrt. Da jedoch das homologe B effektvoller war, muß auch die B - Kette Spezifität besitzen. Ob beide Ketten Aminosäuren besitzen, die Teile der Haftstelle sind, oder ob die Haftstelle nur auf einer Kette lokalisiert ist und durch die andere Kette nur moduliert ist, kann heute noch nicht geklärt werden.

d) Struktur der Haftstellen

Nach der Paulingschen Theorie ist die Antikörperspezifität des γ G-Globulinmoleküls durch die Konfiguration und nicht durch eine bestimmte Primärstruktur bedingt. Es war daher über-

raschend, daß nach Reduktion der Disulfidbindungen die Antikörperaktivität nicht verloren gegangen war, obwohl eine irreversible Änderung von 60 % eingetreten war. (74) Daß die Zerbrechung kovalenter Bindungen zwischen den Polypeptidketten die Antikörperaktivität nicht beeinflußt, war schon von Porter⁵³ 1950 erkannt worden und 10 Jahre später durch die beschriebenen Untersuchungen bestätigt worden.⁵⁹ Besonders überzeugend ist der Befund von Nisonoff und Palmer, daß sich die aus A-B bestehenden halben γ -Globulinmoleküle trotz Blockierung der Thiolgruppen zu 90 % assoziieren und ihre Präzipitationsfähigkeit wiedererlangen. Die paarweise Zusammenlagerung wurde offensichtlich durch nichtkovalente Bindungen bewirkt. Auch den nichtkovalenten Bindungen kann für die Aktivität und die Spezifität des Antikörpers keine allzu große Rolle zukommen. Durch konzentriertes Guanidin Hydrochlorid können z. B. Kaninchen-Antikörper völlig entfaltet werden, sodaß keine Antikörperaktivität mehr festzustellen ist. Nach Entfernung des Guanidins kann sich 75 % des Ausgangsmaterials spezifisch mit komplementärem Antigen wieder verbinden. (146) Dieser Befund spricht sehr gegen die These, daß Aktivität und vor allem Spezifität durch die Konfiguration des Globulinmoleküls bedingt sind. Es ist sehr unwahrscheinlich, daß nach Zerstörung sämtlicher Wasserstoffbrückenbindungen und anderer nichtkovalenter Bindungen 75 % der Moleküle in der alten Konfiguration restauriert werden.

Daß die Aktivität der Haftstellen an bestimmte Aminosäuren gebunden zu sein scheint, wird durch die Inaktivierung durch ausgiebige Jodierung aromatischer Aminosäuren wie Tyrosin oder Histidin erhärtet. Auch die α -amino-Gruppe des Lysins scheint eine Rolle für die Aktivität zu spielen. (144) Vermutlich umfaßt die Haftstelle weniger als 10 Aminosäuren, die oberste Grenze dürfte bei 30 liegen. (144,94)

In jüngster Zeit konnten auch Unterschiede im Aminosäuregehalt zwischen einigen spez. Antikörpern entdeckt werden. (66,67) Da die Primärstruktur durch die DNS bedingt ist, wird die Clonal-Selection-Theorie durch diese Befunde stark unterstützt. Auch in der Verteilung der Antigen determinanten (147) und der Erbfaktoren konnten in manchen Fällen Unterschiede zwischen den spezifischen Antikörpern und dem unspezifischen γ -Globulin beobachtet werden, was ebenfalls für die Clonus-Theorie spricht.

Sollte sich die Tatsache weiter bestätigen, daß sich Antikörper in ihrer Primärstruktur unterscheiden, so bleibt immer noch die Frage offen nach dem Grund der Spezifität, die nur durch das Wissen über die Art der Bindung zwischen dem Antikörpermolekül und dem Antigenmolekül verstanden werden kann. Um kovalente Bindungen kann es sich nicht handeln, da diese in der Größenordnung von 50 - 100 Kcal/Mol liegen. (148) Bei schwächeren Bindungen kann es sich nur um nichtkovalente Bindungen handeln wie Van der Waal'sche Kräfte, elektrostatische Anziehungskräfte und Anziehungskräfte zwischen nicht ionisierten polaren Gruppen. Diese Bindungen sind jedoch nicht spezifisch. Eine Spezifität könnte folglich nur in einer komplementären räumlichen Anordnung des Antikörpermoleküls, wie sie von Pauling gefordert wurde, zu suchen sein. Der oben beschriebene unterschiedliche Gehalt spezifischer Antikörper an sauren und basischen Aminosäuren und der mangelnde Einfluß von Wasserstoffbrückenbindungen auf die Spezifität, könnten dafür sprechen, daß die komplementäre räumliche Struktur der Antikörper-

haftstellen durch elektrostatische Kräfte aufrechterhalten wird. Auch die Abhängigkeit der Antikörper-Antigen Reaktion von der Ionenstärke deutet darauf hin. Da jedoch Änderungen der H^+ -Ionen - Konzentration und der Ionenstärke nicht nur auf die Haftstelle wirken, sondern auf das gesamte Molekül, kann ihr Einfluß auf die Haftstellen auch ein indirekter sein.

D. DIE ENZYMATISCHE SPALTUNG DES γ G - GLOBULINS UND VERWANDTER PARAPROTEINE

Von Peterman ¹⁴⁹ war berichtet worden, daß γ G-Globulin mit Papain oder Bromelin in Fragmente gespalten werden kann. Diese Fragmente besaßen zwar keine präzipitierenden Eigenschaften mehr, konnten jedoch die Reaktion des Vollantikörpers mit dem homologen Antigen hemmen. (Porter ¹⁵⁰) Fragmente dagegen, die durch tryptische oder peptische Degradation entstanden waren, hatten noch präzipitierende Eigenschaften. Da für die enzymatische Spaltung nur rohes Papain in hohem Enzym/Substratverhältnis verwendet werden konnte, wurde die Methode erst wieder 1958 von Porter ¹⁵¹ aufgegriffen, als kristallisiertes Papain zur Verfügung stand. Porter erhielt von Kaninchen- γ G-Globulin Fragmente mit einem Sed. Koeff. $S_{20w} = 3,5$ S, die sich mit dem Kationenaustauscher CM-Cellulose in drei Peaks auftrennen ließen. Das Gewichtsverhältnis von I:II:III war 1 : 0,9 : 1,25. (Porter ¹⁵²) Wurde das Digest dialysiert, ¹⁵² war 10 - 20 % des gesamten Materials dialysierbar. (Porter ¹⁵³, Karush ¹⁵⁴) Bei hoher Papainzugabe konnten bis zu 42 % abdialysiert werden. (Nisonoff et al. ¹⁵⁴) Peak I und II waren in ihrem physico-chemischen und immunologischen Verhalten auffällig ähnlich. Ihr Molekulargewicht betrug 50 000, (Charlwood ¹⁵⁵) außerdem besaßen sie, wenn sie von antikörperhaltigem Serum isoliert wurden, spezifische inhibitorische Wirkung. In den Fragmenten des Peak III konnte keine solche inhibitorische Wirkung nachgewiesen werden. Peak III unterschied sich von I und II auch in seinem physico-chemischen Verhalten. Bei Dialyse gegen Aqua dest. bildete sich ein kristallines Präzipitat. (^{153,151,152,156}) III hatte auch mit I und II keine gemeinsamen Antigendeterminanten, (^{156,157,152}) reagierte im Gegensatz zu diesen mit Rheumaseren. (¹⁵⁸) Auch Human- γ G-Globulin konnte mit Papain in 3,5 S Fragmente aufgespalten werden. (^{159,160,61,157,161,162,113,163}) Es konnten wie beim Kaninchen- γ G-Globulin zwei immunologisch verschiedene Fragmente isoliert werden, das S - Fragment (slow) und das F - Fragment (fast) (⁸⁸). Das S - Fragment ist univalent und Träger der Antikörperhaftstelle (^{160,157,161}), das F - Fragment besitzt keine Antikörperhaftstelle. Das S - Fragment ist auch Träger der Antigentypen I und II, sowie für die Kreuzreaktion mit γ A und γ M verantwortlich. (^{164,16,11,118}) Auf ihm sind auch die InV - Faktoren lokalisiert, während die gruppenspezifischen Gm-Faktoren auf dem F - Fragment lokalisiert sind. (^{110,111,166}) Das F - Fragment ist auch Träger des Gewebefixationsvermögens. (¹⁶⁵) Trotz großer Ähnlichkeit im immunologischen und physico-chemischen Verhalten bereitet die Auftrennung des Human- γ G-Globulindigests im Gegensatz zum Kaninchen einige Schwierigkeiten.

Die Aufgabe unserer Experimente war:

1. Reproduzierbar mit kristallisiertem Papain Human- γ G-Globulin zu degradieren,
2. die Auftrennungsbedingungen des Digests zu untersuchen,
3. die abgetrennten Fragmente zu analysieren,
4. Fragmente von γ G-Paraprotein mit Fragmenten von normalem γ G-Globulin zu vergleichen.

1. METHODEN

I a) Verwendete Seren

Die verwendeten Normalseren stammten sämtlich von gesunden Spendern. Die papierelektrophoretische und immunoelektrische Untersuchung erbrachte Normoproteinämie. In Versuch II - XI wurde Mischserum aus einem Spenderpool verwendet. In Versuch I und XII bis XX wurden Einzelseren verwendet. Die untersuchten Paraproteine stammten jeweils von einem Spender. Blut wurde im Nüchternzustand entnommen und nach Absetzen des Blutkuchens das Serum in Zentrifugenröhrchen abgegossen und bei 3500 Upm 10 min zentrifugiert. Der klare Überstand wurde anschließend 12 Stunden bei 4 °C gegen den bei der Chromatographie verwendeten Startpuffer dialysiert. Hämolytische Seren wurden verworfen. Als Dialysierschläuche dienten nahtlose Schläuche aus Cellulosehydratmembranen, Breite 7 cm. Bei einer durchschnittlichen Füllung des Dialysierschlauches mit 40 - 50 ml Serum wurde gegen 2000 ml Puffer unter ständigem Umrühren mit einem Magnetrührer bei einmaligem Pufferwechsel dialysiert. Nachdem der bei der Dialyse aufgetretene Niederschlag abzentrifugiert worden war, wurde das Serum bis zur Weiterverwendung in der Tiefkühltruhe eingefroren.

I b) Isolierung der γ G - Globuline und der Paraproteine

Entsprechend der Eignung substituierter Cellulose Anionenaustauscher zur chromatographischen Serumfraktionierung (167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175) benützten wir zur Isolierung von normalem γ G-Globulin Diäthylaminoäthyl-Cellulose und zur Isolierung von Paraproteinen DEAE-Sephadex A 50 Medium (Pharmacia). Die in Versuch XXI, XXV und XXVII verwendeten Paraproteine wurden mit DEAE-Cellulose fraktioniert.

1. Vorbereitung der Cellulose und Gießen der Säule

Der Vorgang des Vorbereitens der Cellulose, das Gießen der Säulen, das Auftragen des Serums und die Elution wurden in einer vorausgegangenen Arbeit von Fateh und Knedel ausführlich beschrieben, sodaß eine kurze Zusammenfassung genügt. Neue und gebrauchte DEAE Cellulose wurde in folgender Reihenfolge gewaschen:

O,1 N NaOH

A. Dest. bis Neutralpunkt

O,1 N HCl

A. dest. bis Neutralpunkt

Äquilibrierung mit dem bei der Elution benützten Startpuffer

Nachdem die DEAE-Cellulose mit dem Startpuffer äquilibriert war, wurde sie in demselben Puffer suspendiert (3 %) und mit Hilfe eines Magnetrührers in diesem Zustand gehalten. Die zur Auftrennung von Normalserum verwendeten Säulen besaßen einen Durchmesser von 2,5 cm und eine Länge von 40 cm. Nachdem die Säule mit der Gießflasche verbunden war, wurde unter hydrostatischem Druck eine Zellschicht von 10 cm Höhe gegossen und dann bis zu einer Schichthöhe von 35 - 37 cm kontinuierlich der Druck bis auf 0,6 kg/cm² gesteigert, sodaß die Durchflußrate immer konstant 1 ml/15 sec betrug. Nach Beendigung des Gießvorgangs wurde die Cellulosesäule mit einem dünnen Kartonpapier bedeckt und über Nacht noch einmal unter Druck (Druckpumpe) mit dem Startpuffer äquilibriert.

2. Chromatographische Fraktionierung der Seren

a) Trennung durch Gradientenelution

Die in Versuch I (Serum Ze) und in Versuch II (Serum Kn + Lö) verwendeten Normalseren wurden durch kontinuierliche Gradientenelution bei steigender Konzentration und fallendem pH aufgetrennt. Der Gradient wurde durch einen neunkammerigen Variograd erzeugt.

Startpuffer: 0,01 M Na-Phosphatpuffer pH 7,4 2000 ml
6 Kammern

Grenzpuffer: 0,3 M Na-Phosphatpuffer pH 4,5 1000 ml
3 Kammern

Die Durchflußrate betrug rund 6 ml/16 min. Die aufgetragene Serummenge betrug bei I 16 ml und bei II 30 ml.

Die in Versuch XV, XVII, XXI und XXII verwendeten normalen und pathologischen Fraktionen wurden ebenfalls durch kontinuierliche Gradientenelution auf DEAE-Cellulose gewonnen. Die Bedingungen waren:

für Serum Zo (XXI, XXII) :

Säule: 2,5 cm x 78 cm (Pharmacia)

Aufgetragene Menge: 40 ml

Durchflußrate: 12 ml/30 min

Startpuffer: 0,01 M Na-Phosphatpuffer pH 8,0 2000 ml

Grenzpuffer: 0,30 M Na-Phosphatpuffer pH 4,5 1000 ml

Mischgefäß: Rundkolben

Zulaufgefäß: Erlenmeyerkolben

Mischgefäß und Zulaufgefäß waren durch ein offenes Syphon verbunden.

für Serum Po (XXV) und Zo (XXVII) :

Säule: 2,2 cm x 36 cm

Aufgetragene Menge Zo: 20 ml

Durchflußrate: 8 ml/30 min

Startpuffer: 0,01 M Na-Phosphatpuffer pH 8,0 1000 ml

Grenzpuffer: 0,3 M Na-Phosphatpuffer pH 0,3 500 ml

Sonst bestanden dieselben Bedingungen wie für Serum Zo (XXV). Bei allen chromatographischen Trennungen mit DEAE-Cellulose wurden die Puffer mit Druck (Druckpumpe) auf die Säulen gegeben.

Die pathologischen Seren Si (XXIII), Re (XXIV) und Ba (XXVI) wurden mit DEAE-Sephadex A 50 Medium getrennt.

Die Bedingungen waren:
für Serum Si (XXIII):

Säule: 2,5 cm x 20 cm (Pharmacia)
Aufgetragene Menge: 15 ml
Durchflußrate: 4 ml/30 min
Startpuffer: 0,05 M Na-Phosphatpuffer pH 9 400 ml 1 Kammer
Grenzpuffer: 0,3 M Na-Phosphatpuffer pH 4,5 400 ml 1 Kammer

Der Puffergradient wurde mit einem Varigrad erzeugt.
für Serum Re (XXIV):

Säule: 2,5 cm x 26 cm (Pharmacia)
Aufgetragene Menge: 7 ml
Durchflußrate: 4 ml/26 min

Alle anderen Bedingungen waren wie die bei Serum Si (XXIII)
für Serum Ba (XXVI):

Säule I: 2,5 cm x 28 cm (Pharmacia)
Aufgetragene Menge: 12 ml
Durchflußrate: 4,5 ml/30 min
Startpuffer: 0,05 m Tris-HCl-Puffer pH 8,0 450 ml 1 Kammer
Grenzpuffer: 0,5 m Tris-HCl-Puffer pH 4,5 450 ml 1 Kammer

Der Puffergradient wurde mittels eines Varigrad erzeugt.

Säule II: 2,5 cm x 21 cm (Pharmacia)
Aufgetragene Menge: 10 ml

Der Gradient wurde durch ein Dreikammersystem (Varigrad) erzeugt.

Kammer 1+2: 0,05 M Tris-HCl-Puffer pH 8,0 je 400 ml
Kammer 3 : 0,5 M Tris-HCl-Puffer pH 4,5 400 ml

Auf DEAE Sephadex wurden die Puffer nur unter geringem hydrostatischem Schichtungsdruck gegeben. Die angegebenen Durchflußraten stimmen nur zu Beginn der Elution, da sie während des weiteren Verlaufes stark variieren.

b) Trennung durch Frontanalyse

Aus den Mischseren III - XI wurde das normale γ G-Globulin durch Frontanalyse getrennt. Unter Druck wurden die gegen 0,01 M Na-Phosphatpuffer pH 7,6 dialysierten Seren auf die mit demselben Puffer äquilibrierten, unter 1 beschriebenen Säulen, gegeben, 4 - 6 ml Fraktionen wurden jeweils gesammelt. Nachdem die Säule völlig mit Serum gesättigt war, wurde sie mit 0,7 M Na-Phosphatpuffer pH 4,5 gereinigt.

c) Trennung durch einfache Elutionschromatographie

Die Einzelseren von Versuch XII - XX wurden gegen 0,01 M Na-Phosphatpuffer pH 7,6 dialysiert und jeweils 40 - 50 ml auf die mit demselben Puffer äquilibrierten, unter 1 beschriebenen Säulen gegeben. Nach Einsickern des Serums wurde unter Druck mit 0,01 M Na-Phosphatpuffer pH 7,6 nachgewaschen. Über die chromatographische Verteilung der Immunglobulinfraktionen und Paraproteinfraktionen siehe Fateh und Knedel 178. Die in sämtlichen oben genannten Versuchen von einem zeitgebundenen Fraktionskollektor gesammelten Fraktionen wurden wie folgt weiter behandelt:

1. Die Extinktion jeder Fraktion wurde bei 280 nm mit einem Spektralphotometer gemessen und in ein Extinktionsvolumendiagramm eingetragen.
 2. Die Fraktionen wurden mit Polyäthylenglycol eingeengt.
 3. Die eingeengten Fraktionen wurden
 - a) papierelektrophoretisch untersucht und ihre Beweglichkeit mit der des Ausgangsserums verglichen,
 - b) immunoelktrophoretisch untersucht bei Verwendung von Antihuman-Antiserum und mit Vollserum verglichen,
 - c) immunologisch untersucht im Doppeldiffusionstest nach Ouchterlony bei Verwendung von Antihuman-Antiserum.
 4. Homogene Fraktionen wurden zusammengegossen und mit Sephadex G 25 Medium in den gewünschten Puffer umgepuffert.
 5. Nach Umpuffern der homogenen Immunglobulinfractionen bzw. Paraproteinfractionen wurden diese wiederum mit Polyäthylenglycol konzentriert und mit demselben Puffer auf eine Endkonzentration von 1 g% verdünnt. Nochmalige immunoelktrophoretische Untersuchung brachte völlig Homogenität.
- In diesem Zustand wurden die Proteine der enzymatischen Weiterverarbeitung zugeführt.

II. P a p i e r e l e k t r o p h o r e s e

Die papierelektrophoretische Auftrennung von Serumproteinen ist heute allgemein eine Routinemethode, sodaß auf eine ausführliche Beschreibung verzichtet werden kann. Wir benützten sie zur Identifizierung der Fraktionen, die wir durch die Serumfraktionierung erhalten hatten. Zur Identifizierung der Globulinfractione war diese Methode ungeeignet.

1. Puffer: 58,86 g Na-Diäthylbarbituricum
38,86 g Na-Acetat werden in 4000 ml A. dest. gelöst. 360 ml n/10 HCl werden zugegeben und mit A. dest. auf 6000 ml aufgefüllt.
2. Papier: Whatman Nr. 1. Länge: 22 cm; Breite 14 cm;
3. Färbelös: 5 g Amidoschwarz in 900 ml Methanol + 100 ml Eisessig;
4. Entfärber: 100 ml Eisessig + 900 ml Methanol
5. Ausführung: Der Elphostreifen wird mit Puffer durchnäßt, abgetupft und über die Brücke gelegt. Ca. 0,0065 ml wird 6,5 cm vom unteren Rand und 0,5 cm von der Seite quer zur Laufrichtung 3 cm breit aufgetragen. Auf einem Streifen können drei Fraktionen mit einem Vollserum verglichen werden. Laufzeit: 14 Stunden bei 120 V. Nach Laufende wird der Streifen getrocknet, 10 min gefärbt und anschließend entfärbt.

III. I m m u n o e l e k t r o p h o r e s e

Die erstmals von Grabar und Williams^{177,178} angegebene Methode primärer elektrophoretischer Auftrennung von Eiweißen auf Agargel und sekundärer Doppeldiffusion erwies sich als eine äußerst empfindliche Methode zur Identifizierung und Differenzierung von Proteinen. Wir benützten in unseren Untersuchungen die Modifikation nach Scheidegger¹⁷⁹.

1. Stammlösung: 58,84 g Veronal-Na, 38,84 g Na-Acetat in 2000 ml A. dest. lösen.
2. Stamppuffer: Stammlösung + 2400 ml A. dest. + 400 ml n/10 HCl
3. Gebrauchspuffer: Kammerfüllung: 2 T Stamppuffer + 1 T A.dest.
Agarzubereitung: 1 T Stamppuffer + 2 T A. dest.
4. Bereitung des Agars: Eine 2 %ige Lösung von Reinagar (Behringwerke) in dem Gebrauchspuffer wird 45 min im Dampftopf erhitzt.

Je 2 ml Agar werden auf entfettete Objektträger gegossen, 15 min in eine feuchte Kammer gestellt und anschließend die Mittelrinne für das Antiserum und zwei Depotlöcher ausgestanzt. Die Depotlöcher werden mit der untersuchenden Fraktion gefüllt (0,001 ml) und dann wird in der Elektrophoresekammer 90 min bei 45 mA getrennt. Nach der Trennung wird die Mittelrinne mit Antiserum gefüllt und der Objektträger in eine feuchte Kammer gestellt. Nach voller Ausbildung der Präzipitationslinien werden die Objektträger in eine schlierenfreie Petrischale, die mit 0,9 % NaCl gefüllt ist, gelegt und als negativ beliebig stark vergrößert auf AGFA LUPEX EH 1 (W) Papier projiziert. Anschließend werden die Objektträger 24 Stunden in 0,9 %ige Kochsalzlösung gelegt, um das nichtpräzipitierte Eiweiß aus dem Agar zu lösen. Dann werden sie mit einem Filterpapier bedeckt und an der Luft getrocknet. Nach dem Trocknen werden sie 5 min lang in 2 %iger Essigsäure fixiert, 60 min mit Azokarmin B (Bayer) (0,5 %ige Lösung in Methanol/Eisessig 9 : 1) gefärbt und mit demselben Lösungsmittel ausgiebig entfärbt.

IV. D o p p e l d i f f u s i o n s t e s t n a c h O u c h t e r l o n y

Es handelt sich hier um reine Immunodiffusion. Die Methode ist vor allem für qualitative Analysen geeignet. Ein Vorteil der Methode ist die große Empfindlichkeit, die praktisch abhängig ist von der Menge der in Depots vorhandenen Reaktionspartner. (Crowle 1980)

Agarbereitung: 15 g Reinagar (Behringwerke) wird in 1000 ml Wasser 4 - 6 Stunden aufgequellt. Dann wird der Agar im Wasserbad erhitzt, bis er dünnflüssig und klar ist und bei 4 ° C aufbewahrt.

Vorbereitung der Platten : Der Agar wird im Wasserbad erwärmt, bis keine Luftblasen mehr aufsteigen und dann 12 - 14 ml auf entfettete Photoplatten (8,5 cm x 10 cm) aufgegossen. Dann kommen die Platten für einige Stunden in eine feuchte Kammer. Erst bei Gebrauch werden die Depots ausgestanzt.

Wir verwendeten eine Rosettenform mit 6 Antigendepots und einem Antiserumdepot im Centrum.

Durchmesser des Antiserumdepots: 6 mm
Durchmesser der Antigendepots : 2,5 mm
Abstand Antiserum - Antigendepot: 7,5 mm

und eine Dreierkombination:

Durchmesser des Antiserumdepots: 3 mm
Durchmesser der Antigendepots : 3 mm
Abstand aller Depots voneinander: 7 mm

Diese Anordnungen haben sich in unseren Versuchen sehr bewährt. Die in der Immunoelktrophorese und im Ouchterlony verwendeten Antiseren waren:

Anti- γ G-Globulinserum vom Kaninchen Charge 505,

Anti-Humanserum vom Kaninchen Charge 596,

Anti- γ Makroglobulinserum vom Pferd.

Die Antiseren wurden von den Behringwerken Marburg bezogen.

Nachdem die Präzipitationslinien voll entwickelt waren, wurden die Platten nativ photographiert und sonst weiterbehandelt wie die Immunoelktrophoreseplatten.

V. U l t r a z e n t r i f u g a t i o n

Zur Bestimmung der Sedimentationskoeffizienten und zur Prüfung der Homogenität der untersuchten Globuline und ihrer Fragmente verwendeten wir eine Spinco Model E (Beckman) Analytical Ultrazentrifuge. Bei sämtlichen Läufen wurde eine 12 mm Standardzelle verwendet. Untersucht wurden: Undegradiertes Globulin, degradiertes Globulin vor Dialyse und Auftrennung und die isolierten Peaks, die den S und F Fraktionen entsprachen. Außer den verschiedenen Lösungsmitteln (0,9 % NaCl, 0,01 M Na-phosphatpuffer pH 6,0) und Proteinkonzentrationen waren die einzelnen Laufbedingungen gleich. Rotor: AN-D, Zelle: 12 mm Standardzelle, Range: 5, Balance: 614, Temperatur: 20°C, Geschwindigkeit: 56 000 U.p.M. Nach Erreichen der vollen Geschwindigkeit und nach Ablösen des ersten Peaks vom Meniskus wurde im Abstand von 16 min photographiert. Der Lauf dauerte bei den Fragmenten in der Regel 4 Stunden und 30 Minuten. Die Sedimentationskoeffizienten wurden berechnet und der Effekt der Pufferkonzentration korrigiert auf Wasser.

VI. Q u a n t i t a t i v e E i w e i ß b e s t i m m u n g

Wir benötigten eine Methode, die einerseits sehr empfindlich und gleichermaßen spezifisch für Peptide und Proteine ist, andererseits keinen großen zeitlichen und apparativen Aufwand benötigt. Biuret und Mikrokjeldahl schieden daher aus. Ebenso ungeeignet war die spektrophotometrische Bestimmung bei 280 nm, da nur die aromatischen Aminosäuren erfaßt werden. Auch die von Tombs et al.¹⁸¹ vorgeschlagene Bestimmung bei 210 nm, die nur die Peptidbindungen erfaßt, schien ungeeignet, da die Proteine keinen hohen Gehalt an Aromaten besitzen dürfen. Als sehr gut geeignet schien uns die erstmals von Wu¹⁸² angegebene nach Lowry et al.¹⁸³ modifizierte Folinreaktion.

Reagens 1: 2 g Na_2CO_3 werden in 100 ml n/10 NaOH gelöst.

Reagens 2: 1 g Na₂K₂ Tartrat werden in 100 ml A. dest. gelöst und dann 0,5 mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ zugegeben.

Reagens 3: 2 ml Reagens 2 werden in 100 ml Reagens 1 gegeben.

Reagens 3 wird immer frisch zubereitet und sofort verwendet.

Reagens 4: Folin-Ciacaltea Phenol Reagens (Merck) wird mit dem doppelten Volumen A. dest. verdünnt, sodaß es 1 N ist.

Bestimmung:

0,6 ml Proteinlösung werden mit 3 ml Reagens 3 versetzt. Nach 10 min Stehenlassen bei Raumtemperatur wird innerhalb weniger Sekunden (wichtig!) Reagens 4 dazugegeben.

Nach einstündigem Stehen bei Raumtemperatur wird der Ext.-Koeff. der blau gefärbten Lösung in einer 1 cm Glasküvette bei 500 nm gegen Leerwert abgelesen.

Eichkurve:

Zur Aufstellung der Eichkurve diente lyophilisiertes Rinder- γ G-Globulin. Es wurden 10 Standardlösungen 1 g % durch Einwaage hergestellt und durch Verdünnung die Eichpunkte festgelegt. Die resultierenden Eichkurven erfüllten das Lambert-Beersche Gesetz.

VII. E n z y m a t i s c h e S p a l t u n g

Es gibt eine Reihe verwandter Pflanzenproteasen, die eine stärkere proteolytische Wirkung als Pepsin und Trypsin besitzen. So können diese pepsin- oder trypsinverdaute Proteine in noch kleinere Einheiten degradieren, jedoch nicht umgekehrt. (Calvery 184) Das meistuntersuchte Pflanzenenzym ist das Papain. Sehr ähnlich verhalten sich auch Ficin (185), Bromelin (186), Asclepain (187), Mexicanin, Pinguinanin und andere. Diese Pflanzenproteasen können auch γ G-Globulin in fast identischer Weise spalten. (188) Wir verwendeten für die Degradation Papain.

Papain wurde schon früh aus dem Milchsafte von Carica papaya isoliert und erstmals von Wurtz (1880) 189 genauer untersucht. Bald wurde erkannt, daß durch Zugabe bestimmter Antiseptica wie Cyanid, H_2S oder Reduktionsmittel wie Cystein, Glutathion und Ascorbinsäure das rohe Milchsafteextrakt 191 aktiviert wurde. (190) 1924 fanden Willstätter und Grassmann 191 in Papain die erste Protease, die synthetische Peptide hydrolysieren konnte. Die Arbeitsgruppe um Bergmann konnte feststellen, daß Papain auf acylierte Peptide, auf Aminosäureamide und auf völlig substituierte Peptide die Funktion einer Exo- oder Endopeptidase ausüben kann. (Bergmann et al. 192, 193) So konnte auch eine Einwirkung von Aktivatoren auf die Substratspezifität beobachtet werden. (194) 1937 konnten Balls et al. 195 Papain kristallisieren, sodaß damit bessere Untersuchungsbedingungen geschaffen waren. Eine weitere Verbesserung der reinen Isolierung von Papain wurde 1954 von Kimmel und Smith 196 angegeben. Papain liegt als monomere Struktur vor (Smith et al. 197) (Das Molekulargewicht = 20700) und besteht aus einer einzigen Polypeptidkette mit 148 N-terminale Aminosäuresequenz Ileu - Pro - Glu. (Thompson 198)

Aktivierung:

Da durch Zugabe von Reduktionsmitteln wie Cystein, Glutathion u.s.w. das Enzym aktiviert wird und andererseits durch oxydierende Mittel das Papain inaktiviert wird, vermuteten Bersin und Logemann (1933) 199, daß die Aktivität des Papains vom reduzierten Zustand der SH-Gruppen abhängig ist. Schon Krebs 200 (1930) versuchte die Aktivierung durch Cyanide, H_2S , Sulfide u.s.w. dadurch zu erklären, daß natürlich vorkommende Schwermetallionen, die mit den Thiolgruppen Komplexe bilden, durch Zugabe dieser Reagentien gebunden werden. Spätere Untersuchungen stellten die Bedeutung der Thiolgruppen für die Enzymwirkung klar heraus.

So können sämtliche Reagentien, die mit Thiolgruppen reagieren, z. B. Schwermetallionen, organische Hg-Verbindungen, alkylierende Reagentien und Oxydationsmittel Papain völlig inaktivieren. Die volle Aktivität des Enzyms wird wiederhergestellt, wenn durch schwermetallbindende Mittel und Reduktionsmittel die Thiolgruppen wieder restauriert werden. (Kimmel et al. 196)

Die starke Affinität des Papains für Schwermetallionen gestattete es, inaktive Derivate wie Mercuripapain zu kristallisieren. Dieses Mercuripapain neigt nicht zur Autodigestion und kann bei 4 °C bequem über lange Zeit ohne wesentlichen Aktivitätsverlust aufbewahrt werden. Ein weiterer Vorteil ist der, daß eine sehr homogene Enzymfraktion durch die Komplexbildung mit Hg-Ionen und die Kristallisation erhalten wird. (196) Ein Molekül Papain kann maximal 1 Atom Quecksilber binden. (Finkle und Smith 201)

Untersuchungen mit para-Chlormercuribenzoat zeigten, (201) daß eine Thiolgruppe reaktiv ist und daß der proteolytische Koeff. für die Hydrolyse von Benzoyl-L-Argininamid eine Funktion der Thiolgruppen ist, die mit PCMB reagieren. Die Reaktion dieser Thiolgruppen mit PCMB (0,001 M) ist innerhalb von zwei Minuten völlig abgeschlossen (Smith 202).

Kimmel und Smith 196 konnten auch eine bemerkenswerte Abhängigkeit der Enzymaktivität des Papains von der Art des verwendeten Puffers und dem pH beobachten. So war z. B. bei alkalischem pH die Aktivität in Pripuffer nicht meßbar, bei Phosphatpuffer des gleichen pH jedoch genügend Aktivität vorhanden. Sie bezogen das auf die Fähigkeit von Anionen, mit Metallionen Komplexe zu bilden. Bei Zugabe von Versen (EDTA) und Cystein war unabhängig vom verwendeten Puffer die Enzymaktivität zwischen pH 5,0 und 7,5 maximal.

Spezifität:

Papain besitzt eine weite Spezifität. So kann es Substrate spalten, die spezifisch sind für Pepsin, Trypsin, Chymotrypsin und Peptidasen (203) und katalysiert die Hydrolyse, Gruppenübertragung oder Bildung von Peptiden, Estern, Hydraziden, Hydromaten, Aniliden u.s.w. (204). Die Bedeutung einer freien SH-Gruppe für die Enzymaktivität kann aus energetischen Gründen nicht aufrechterhalten werden. Die reaktive SH-Sulphydrylgruppe muß auf einem energetisch höheren Niveau liegen, da zum Beispiel die Bildung von Estern eine freie Energie von 10 - 12 Kcal benötigt. Smith 202, 205 nimmt an, daß eine solche hochenergetische Bindung in Form eines Thioesters vorliegt. Die oben beschriebene Aktivierung des Enzyms durch Reduktion von Disulfidbindungen zu SH-Gruppen scheint nicht der wesentliche Faktor für die Aktivierung zu sein.

Versuchsbedingungen

In unseren Versuchen berücksichtigten wir die oben beschriebenen Eigenheiten des Papains. Wir verwendeten das gegen Autolyse sehr stabile, hochgereinigte Mercuripapain doppelkristallisiert, das wir von der Fa. Worthington Biochemical Corp. bezogen.

Mercuripapain: HG - PAP 6111 Konz. 49 mg/ml Activity 13 u/mg
Das Mercuripapain wurde im Eisschrank bei 4 °C aufbewahrt.

Eiweißkonzentration: 1 g/%

Papain : 1 mg Enzym auf 100 mg Substrat

Puffer : Versuch

I 0,01 M Na-acetatp. pH 5,5

II-III, IV, XX-XXVI 0,01 M Na-phosph.p pH 6,0

V-XIX 0,01 M Na-phosph.p pH 7,6

Das in 70 %iger Äthanollösung suspendierte, im Handel befindliche Papain wurde kräftig geschüttelt und mit einer Micropipette mit mechanischem Vorschub die der verwendeten Proteinmenge entsprechende Enzymmenge in einen 50 ml Erlenmeyerkolben titriert. Nach Abdampfen des Alkohols wurde die in dem oben angegebenen Puffer gelöste 1 %ige Proteinlösung zugegeben und die Lösung mit den benötigten Aktivatoren versetzt.

Aktivatoren: l-Cystein 0,001 M

Versen = EDTA 0,002 M (Äthylendiamintetraessigsäuredinatriumsalz)

Nach Zugabe der Aktivatoren und des als Antisepticum verwendeten p-Cl-Toluols wurde der Erlenmeyerkolben verschlossen und unter ständigem Schütteln im Brutschrank bei 36 °C in der Regel 16 Stunden inkubiert. (veränderte Inkubationszeit siehe Ergebnisse) Nach abgelaufener Inkubationszeit wurde die Hydrolyse durch Zugabe von PCMB (para-Chlormercuribenzoat), das die Reaktion innerhalb von 2 min zu stoppen vermag, unterbrochen und die Lösung auf 4 °C abgekühlt. Anschließend wurde ausgiebig dialysiert oder mit Sephadex G 25 Medium chromatographiert. (siehe Ergebnisse)

VIII. Chromatographische Auftrennung der Fragmente

1. Trennung der Peptide durch Gel-Filtration

Zur Trennung der hochmolekularen Verbindungen von den niedermolekularen benützten wir Sephadex G 25. (Porath und Flodin) Sephadex G 25 wurde in dem gewünschten Puffer durch kräftiges Schütteln suspendiert und in eine Glassäule gefüllt. Suspension wurde solange zugegeben, bis die gewünschte Höhe erreicht war. Die gleiche Säule kann immer wieder benützt werden.

Elutionsbedingungen: Säule: 2,5 cm x 35 cm (in allen Versuchen gleich)

Aufgetragene Menge: 15 - 20 ml Digest

Durchflußrate: 4 ml / 2 min

Elutionspuffer: der bei der anschließenden Chromatographie benötigte.

Die Fraktionen der einzelnen Peaks wurden zusammengegossen und der Eiweißgehalt jedes Peaks bestimmt. In Versuch I - V wurden die niedermolekularen Anteile durch Dialyse getrennt. In allen anderen Versuchen wurde dazu G 25 benützt.

2. Trennung der hochmolekularen Fragmente

Da papainverdautes γ G-Globulin vom Kaninchen durch Chromatographie auf dem Kationenaustauscher Carboxymethylcellulose (167, 168) fraktioniert werden konnte (162, 206, 207, 208) und von

Hsiao und Putnam ⁶¹ und Deutsch et al. ¹⁶² auch für fragmentiertes Human- γ G-Globulin eine Auftrennung mit CM-Cellulose beschrieben wurde, versuchten wir eine ähnliche Fraktionierung mit CM-Cellulose zu erreichen.

a) Fraktionierung mit CM-Cellulose

aa) Vorbereiten der Cellulose und Gießen der Säule

Um maximale Kapazität zu erhalten, wurde neue und gebrauchte CM - Cellulose in folgender Reihenfolge gewaschen:

0,5 N NaOH - 0,5 M NaCl

A. Best. bis Neutralpunkt

Äquilibrieren mit dem bei der Elution benützten Startpuffer.

Trotz Zusatz von NaCl war die durch das Alkali bedingte Schwellung sehr stark, sodaß die Cellulose laufend aufgerührt werden mußte. Nachdem das gesamte Alkali entfernt war, wurde eine gute Durchflußrate erreicht. Die Technik des Waschens und Gießens war wie unter I b) beschrieben.

bb) Chromatographische Fraktionierung

Kontinuierliche Gradientenelution

In Versuch I und II wurde versucht, eine Trennung durch kontinuierliche Elution zu erreichen. Die Bedingungen waren für

Versuch I: Säule: 2,5 cm x 34 cm

Aufgetragene Menge: 10 ml (55,5 mg) dialysiertes Digest

Durchflußrate: 6 ml/6 min

Startpuffer: 0,1 M Na-Acetatpuffer pH 5,5 400 ml

Grenzpuffer: 0,5 M Na-Acetatpuffer pH 5,5 400 ml

Mischgefäß : Rundkolben 500 ml

Zulaufgefäß: Rundkolben 500 ml

Toluolzusatz und Anschluß ans Uvicord Spectrophotometer

Nach Einsickern des Digests wurde mit 2 ml Startpuffer nachgewaschen und dann unter Druck eluiert. Der Gradient wurde durch zwei Rundkolben, die durch ein Syphon verbunden waren, erzeugt.

Versuch II: Säule: 2,5 cm x 30 cm

Aufgetragene Menge: 15 ml (150 mg) nichtdialysiertes Digest

Durchflußrate: 7,4 ml/20 min

Startpuffer: 0,01 M Na-Phosphatpuffer pH 6,0 400 ml

Grenzpuffer: 0,01 M Na-Phosphatpuffer pH 6,0 -
0,4 M NaCl 200 ml

Der Gradient wurde erzeugt durch einen Varigrad 2 x 2 Kammern.

Diskontinuierliche Gradientenelution

In Versuch III und IV wurde mit stufenweiser Elution chromatographiert. Nach Erscheinen des ersten Peaks wurde der Startpuffer abgesetzt und mit dem zweiten Puffer nachgewaschen.

Säule: 2,5 cm x 30 cm
 Aufgetragene Menge: rund 1/100 der Cellulosemenge
 nichtdialysiertes Digest
 Durchflußrate: 4,5 - 5 ml/16 min
 Startpuffer : 0,01 M Na-Phosphatpuffer pH 6,0
 2. Puffer : 0,01 M Na-Phosphatpuffer pH 6,0
 0,4 M NaCl (1:1)

Rechromatographie der in Versuch IV erhaltenen Peaks:

Der in Versuch IV erhaltene Peak II wurde rechromatographiert auf CM-Cellulose. Die Elution war wie bei III und IV diskontinuierlich.

Säule im Versuch IV: 2,5 cm x 33 cm
 Aufgetragen: 8,5 ml Peak II (Vers. IV)
 Elution wie oben unter bb)

Versuch IV 3a:

Säule: 1,2 cm x 28 cm
 Aufgetragen: Fraktion 16 - 24 aus IV₂
 Elution wie unter bb)

Versuch IV 3b:

Säule: 1,2 cm x 34 cm
 Aufgetragen: Fraktion 46 - 53 aus IV₂
 Elution wie oben unter bb)

b) F r a k t i o n i e r u n g m i t D E A E - C e l l u l o s e

Die Fragmente in Versuch V - XIII wurden mit dem Anionenaustauscher DEAE-Cellulose chromatographiert. Das Vorbereiten der Cellulose und das Gießen der Säulen wurde wie unter I b) angegeben gehandhabt. In sämtlichen Versuchen V - XIII wurde unter kontinuierlicher Gradientenelution bei konstantem pH und ansteigender Konzentration eluiert. Die Elutionsbedingungen waren jeweils die gleichen.

Säule: 2,5 cm x 30 cm
 Aufgetragene Menge: zwischen 5 und 10 ml des mit Sephadex G 25 gereinigten Digests.
 (Protein 1/100 Cell)
 Durchflußrate: 3,5 - 4 ml/16 min
 Startpuffer : 0,01 M Na-Phosphatpuffer pH 7,6 500 ml
 Grenzpuffer : 0,7 M Na-Phosphatpuffer pH 7,6 500 ml
 Mischgefäß : 500 ml Rundkolben
 Zulaufgefäß : 500 ml Rundkolben

Die Rundkolben waren durch ein Syphon verbunden. Der Puffer wurde durch eine Druckpumpe auf die Säule gegeben. Die Fraktionen wurden durch einen zeitgebundenen Fraktionskollektor gesammelt.

c) F r a k t i o n i e r u n g m i t D E A E - S e p h a d e x A 5 0 M e d i u m

Zu dem Zeitpunkt, als diese Experimente durchgeführt wurden, war über die Verwendung von Sephadex - DEAE-Cellulose zur Fraktionierung von Papainfragmenten noch nichts bekannt. Da dieser

Ionenaustauscher eine bedeutend höhere Kapazität besitzt als DEAE-Cellulose, glaubten wir dadurch eine bessere Auftrennung zu erreichen. Die angegebenen Bedingungen treffen für alle Versuche von XIV - XXVII zu, sowohl für normale γ -Globuline als auch untersuchte Paraproteine.

aa) Vorbereitung der Cellulose

DEAE - Sephadex A 50 Medium (Pharmacia) wurde in folgender Reihenfolge gewaschen:

Quellen mit H_2O und abdekantieren

0,5 n HCl

A. dest. bis Neutralpunkt

0,5 n NaOH

A. dest. bis Neutralpunkt

Äquilibrieren mit gewünschtem Puffer

Nachdem DEAE-Sephadex mit dem bei der Chromatographie verwendeten Startpuffer äquilibriert war, wurde es in dem Startpuffer in einer Konzentration suspendiert, bei der eben noch Luftblasen aufsteigen konnten. Dann wurde die Suspension in einer Saugflasche mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt, bis keine Blasen mehr aufstiegen. Nach dem Absaugen wurde die Suspension sehr vorsichtig in eine Pharmaciasäule (3 cm x 40 cm) eingefüllt und solange nachgefüllt, bis die Packung eine Höhe von 35 cm erreicht hatte. Dann wurde auf die Oberfläche der Cellulose ein Nyloonsieb gelegt, die Säule verschlossen und mit einem Pufferreservoir verbunden. Der Flüssigkeitsspiegel des Reservoirs stand in gleicher Höhe wie der obere Spiegel der Säule. Über Nacht wurde die Säule noch einmal mit Startpuffer gewaschen, um eine gleichmäßige Schichtung zu erreichen. Die Durchflußrate konnte durch Höher- oder Tieferstellen des Pufferreservoirs geregelt werden. Diese Anordnung war denkbar einfach und verhinderte ein Zusammensintern der Cellulose.

bb) Gradientenelution

Die Fraktionierung wurde mit kontinuierlicher und diskontinuierlicher Gradientenelution bei konstantem pH und ansteigender Konzentration durchgeführt. Die Bedingungen waren:

Säule : Pharmaciasäule 3 cm x 35 cm

Aufgetragene Menge: 100 - 200 mg Digest (10-15 ml)

Durchflußrate : war großen Schwankungen unterworfen

Startpuffer : 0,05 M Tris-HCl Puffer pH 8,0
500 ml

Grenzpuffer : 0,5 M Tris-HCl Puffer pH 8,0
500 ml

Mischgefäß : Rundkolben 500 ml

Zulaufgefäß : Erlenmeyerkolben 500 ml

Mischgefäß und Zulaufgefäß waren durch ein Syphon verbunden. Während des Laufes sinterte die Cellulose stets um ein Drittel zusammen. Dies hatte jedoch keinen beträchtlichen Einfluß auf die Trennschärfe zur Folge. Bei diskontinuierlicher Elution wurde nach Erscheinen des ersten Peak mit dem höhermolekularen Puffer nachgewaschen.

Die von einem zeitgebundenen Fraktionskollektor gesammelten Fraktionen wurden auf folgende Art weiterbehandelt:

1. Die Extinktion E_{280} jeder Fraktion wurde bei 280 nm gemessen und in ein Extinktionsvolumendiagramm eingetragen.
2. Homologe Fraktionen wurden zusammengegossen und mit Polyäthylenglycol konzentriert.
3. Die Fraktionen wurden immunoelektrophoretisch, immunologisch in der UZ weiteruntersucht.

2. E R G E B N I S S E

I. D e g r a d a t i o n v o n γ G - G l o b u l i n

γ G-Globulin wurde in genügend großer Ausbeute chromatographisch gewonnen. Die zur Degradation bestimmten Fraktionen besaßen für γ G-Globulin charakteristische elektrophoretische Beweglichkeit. Sie ergaben in der Immunelektrophorese und im Doppeldiffusionstest nach Ouchterlony mit Antihumanserum nur eine Präzipitationslinie und sedimentierten in der Spinco E bei 56 100 U.p.M. als einheitliche Fraktion mit einem Sed. Koeff. $S_{20w} = 6 - 7$ S. (Abb. 10 a)

Wenn diese γ G-Globulin-Fraktionen mit aktiviertem Mercuripapain in 0,01 M Acetatpuffer pH 5,5, 0,01 M Na-Phosphatpuffer pH 6 oder 0,01 M Na-Phosphatpuffer pH 7,6 16 Stunden lang inkubiert wurden, dann konnte man eine Umwandlung des Ausgangsmaterials beobachten. Das enzymatisch behandelte Globulin sedimentierte bei 56 100 U.p.M. wesentlich langsamer als das Ausgangsmaterial (Abb. 11b) (Sed.Koeff. $S_{20w} = 3,6$ S) Eine Komponente mit schnellerer oder langsamerer Beweglichkeit konnte von uns nicht entdeckt werden, sodaß auf Homogenität der sedimentierenden Fraktion geschlossen werden darf. Die Umwandlung schien bei den von uns verwendeten Bedingungen vollständig.

Auch die Immunelektrophorese ergab ein verändertes Bild. Vor der enzymatischen Degradation besaß γ G-Globulin eine lange, sichelförmige, sich bis in den α_2 -Bereich erstreckende Präzipitationslinie; nach Degradation könnten im gleichen Wanderungsbereich zwei sich überkreuzende Präzipitationslinien identifiziert werden. Beide Komponenten scheinen keine Identität zu besitzen. (Abb. 9 a)

Auf Grund dieser Umwandlung versuchten wir, die entstandenen Fragmente aufzutrennen.

1. A b t r e n n u n g u n d U n t e r s u c h u n g d e r P e p t i d e .

Porter hatte berichtet, daß durch die Papainspaltung 10 - 20 % des Materials in Form von Peptiden frei wird. Dieser Befund wurde für degradiertes Human- und Kaninchen- γ G-Globulin von allen späteren Untersuchern bestätigt. Die Peptide lagen in einer Größenordnung, die ihnen die Passage durch Dialysemembranen gestatteten. Auch wir versuchten, die Peptide, die bei der Spaltung entstehen, durch ausgiebige Dialyse zu entfernen. Bei Dialyse gegen A. dest. konnten wir beobachten, daß ein geringer Niederschlag im Dialyseschlauch auftritt. Dieser Niederschlag betrug ungefähr 4 % des nicht dialysierbaren Materials und löste sich in 0,01 M Na-Phosphatpuffer pH 6 wieder auf. Wegen der geringen Menge dieses Niederschlags untersuchten wir ihn nicht weiter.

Zur Abtrennung der Peptide und zu ihrer quantitativen Erfassung erwies sich in unseren Untersuchungen die Dialyse als sehr schlecht geeignet. Bei gleichen Inkubationsbedingungen waren die gemessenen Peptidwerte sehr unterschiedlich. In einem Fall betrug die abdialysierte Proteinmenge 18 % des Gesamtmaterials, in einem anderen Fall konnten 30 %, ja bis zu 50 % abdialysiert werden. Diese Abweichungen waren offensichtlich dadurch bedingt, daß gegen relativ große Mengen Puffer (2000 ml) bei mehrmaligem Wechsel dialysiert wurde. Die Peptide waren folglich in so geringer Konzentration vorhanden, daß in einem Meßbereich gearbeitet wurde, bei dem die Abweichung vom Mittelwert relativ groß ist. (Bereich unter 5 mg%) Wurde der nichtdialysierbare Anteil mengenmäßig mit dem Ausgangsmaterial verglichen, so ergaben sich noch unterschiedlichere prozentuale Werte. Ein weiterer Nachteil ist, daß Toluol schon in geringer Konzentration mit Folinreagens eine intensive Färbung gibt. Außerdem konnten selbst durch ausgiebige Dialyse nicht sämtliche Peptide entfernt werden, wie die nachfolgende Ionenaustauscherchromatographie zeigte.

Wir versuchten deshalb eine Abtrennung durch Adsorptionschromatographie mit dem hochvernetzten Dextran Sephadex G 25. (siehe methodischer Teil) In 15 Versuchen erhielten wir konstant fünf Peaks. (Abb. 1) Peak I erschien sehr konzentriert innerhalb weniger Fraktionsröhrchen und wurde an der Säule kaum adsorbiert. Der nachfolgende Peak II war vom absteigenden Schenkel des Peak I nicht immer sehr scharf getrennt. Das Größenverhältnis dieser Peaks zueinander (siehe Abbildung) war während sämtlicher Versuche konstant. Ein konstantes Mengenverhältnis zwischen II, III und IV konnten wir nicht feststellen, obwohl eine solche Beziehung zu bestehen scheint. Die Identifizierung dieser Peaks ergab, daß Peak I sämtliche makromolekularen Komponenten enthält. Peak II, III und IV bestehen aus Peptiden, die völlig dialysierbar sind. Immunologisch besitzen sie keine Aktivität. Auch in der Ultrazentrifuge oder elektrophoretisch konnten wir keine höhermolekularen Fragmente in ihnen nachweisen.

Um die Peptide noch weiter aufzulösen, versuchten wir eine papierchromatographische Auftrennung durchzuführen. (Papier Schleicher Schüll 2043 b, Fließmittel: Eisessig: Butanol: A. dest. = 4 : 1 : 1 aufsteigend) Peak I wanderte überhaupt nicht. Peak II, III und IV wanderten nur ganz gering von der Auftragsstelle weg, zeigten jedoch nach IV zunehmend eine Schwanzbildung. In Peak V konnte nur eine ganz geringe Schwanzbildung festgestellt werden. Er enthielt im wesentlichen die Aktivatoren PCMB und p-Cl-Toluol.

Charakteristische Unterschiede zwischen den einzelnen Peaks konnten auch durch Bestimmung des Absorptionsspektrums festgestellt werden. Peak I, der die hochmolekularen Komponenten enthält, hat wie unbehandeltes γ G-Globulin bei 250 nm ein Minimum und bei 280 nm ein Maximum. Sein Kurvenverlauf entspricht dem des unbehandelten γ G-Globulins. Völlig anders verhalten sich Peak II, III und IV. Sie besitzen bei 250 nm ein für Peptide charakteristisches Ansteigen der Absorptionskurven.

Weiter interessierte uns, inwieweit die Freisetzung von Peptiden bei gleichen Bedingungen abhängig ist von der Inkubationszeit. Wir verwendeten dazu γ G-Globulin aus einem Pool immer in

derselben Konzentration. (Puffer 0,01 M Na-Phosphatpuffer pH 6)
Die Versuchsbedingungen waren bei sämtlichen Proben gleich.

<u>Inkubationszeit</u>	<u>Peptide</u>
3 Stunden	10 %
6 Stunden	12 %
12 Stunden	14,5 %
16 Stunden	20 %
20 Stunden	26,2 %

Die Peptide wurden mit Sephadex G 25 fine abgetrennt und die prozentualen Werte bezogen auf das Ausgangsmaterial. Wiedergewinnungsrate 100 % $\pm$ 5 %. Wie aus der Tabelle zu ersehen, ist die Freisetzung von Peptiden proportional der Inkubationszeit. Bei Verwendung von 0,01 M Na-Phosphatpuffer pH 7,6 konnten wir beobachten, daß weniger Peptide freigesetzt werden. Nach Abtrennung der Peptidfraktionen wurde die 3,6 S Fraktion eingeeengt und chromatographisch aufgetrennt.

2. Chromatographische Auftrennung mit dem Kationenaustauscher Carboxymethyl-Cellulose

Von Hsiao und Putnam⁶¹ und Franklin et al.¹⁶⁰ war berichtet worden, daß durch Chromatographie auf CM-Cellulose unter den Bedingungen Porters keine Auftrennung, wie sie bei degradiertem Kaninchen- γ G-Globulin beobachtet worden war, erhalten wurde. Auch wir erzielten unter diesen Bedingungen keine Auftrennung. Es wurden zwei Peaks eluiert. Der erste schmalbasige enthielt jedoch nur Peptide (die durch Dialyse nicht vollständig entfernt worden waren) und der zweite breitbasige entsprach genau dem Digest, das aufgetragen worden war. Da Hsiao und Putnam durch Verwendung von 0,01 M Na-Phosphatpuffer pH 6 mit einem ansteigenden NaCl - Konzentrationsgradienten eine Trennung der 3,5 S Fragmente beschrieben, versuchten wir unter gleichen Bedingungen einen ähnlichen Befund zu erhalten. Wir erhielten zwei Peaks, einen schmalbasigen, der kaum adsorbiert wurde und nach Einsetzen des Konzentrationsgradienten einen sehr breitbasigen Peak. (Fraktion 40 - 71, Elutionsvolumen = 220 ml) Peak I konnte wie im ersten Versuch Dialysmembranen vollständig passieren. Auch antigene Eigenschaften konnten nicht nachgewiesen werden. Er bestand im wesentlichen aus Peptiden. Höhermolekulare Produkte konnten nicht erfaßt werden. Die Fraktionen des Peak II besaßen alle eine langsamere wandernde = S (slow Fraktion nach Edelman) Fraktion und eine schneller wandernde = F (fast Fraktion) Fraktion. Die S und F Komponenten der einzelnen Fraktionen zeigten jedoch unterschiedliche Beweglichkeit. Auch im Versuch III konnte kein anderer Befund erhoben werden, obwohl mit diskontinuierlicher Elution gearbeitet wurde. Der einzige Unterschied war, daß das Elutionsvolumen des Peak II etwas geringer war. In Versuch IV versuchten wir mit denselben Puffern unter diskontinuierlicher Elution durch mehrmalige Rechromatographie der eluierten Peaks eine Auftrennung zu erreichen.

Trotz ausgiebiger Dialyse gegen den Startpuffer wurde wiederum ein schmalbasiger Peak I eluiert, dessen Komponenten an die Cellulose kaum gebunden wurden. (Abb. 2) Auch in diesem Fall konnten keine höhermolekularen Komponenten identifiziert werden.

(Elutionsvolumen = 35 ml) Nachdem er erste Peak eluiert war, wurde mit dem höhermolekularen Puffer nachgewaschen. Nach etwas geringerem Durchflußvolumen als bei der kontinuierlichen Elution wurde ein breitbasiger Peak eluiert. (Elutionsvolumen = 90 ml) Die einzelnen Fraktionen des Peak II zeigten immunoelektrophoretisch mit dem aufgetragenen Digest ein identisches Bild. Die Fraktionen dieses Peak II wurden zusammengegossen, eingeengt und unter identischen Bedingungen rechromatographiert. Wiederrum wurden zwei Peaks eluiert. (Abb. 3) Peak I r erschien in Fraktion 16 - 24 (40 ml) und Peak II r nach Einsetzen der höhermolekularen Gradienten. (35 ml) Immunoelektrophoretisch bestand Peak I aus einer sich überkreuzenden S und F Komponente. Der etwas kleinere Peak II r enthielt ebenfalls eine S und F Komponente, die sich immunoelektrophoretisch jedoch nur noch berührten. (Abb. 5) Die Fraktionen der einzelnen Peaks wurden wieder zusammengegossen, eingeengt und mit diskontinuierlicher Gradientenelution wie oben rechromatographiert. Peak I r konnte in einen Peak A und in einen Peak B aufgetrennt werden. (Abb. 4) Ein völlig identisches Bild wurde auch durch die Rechromatographie des Peak II r erzielt. Der erste Peak wurde C und der zweite D bezeichnet. B und D lagen in so geringer Konzentration vor, daß sie immunoelektrophoretisch nicht mehr erfaßt werden konnten. C enthielt eine S und eine F Komponente, die immunoelektrophoretisch völlig auseinander gerückt waren. A bestand aus einer Komponente, die der Überkreuzung von S und F entsprachen.

Da Verwendung des Kationenaustauschers CM-Cellulose keine Trennung in Einzelkomponenten bewirkte, versuchten wir eine Auftrennung mit dem Anionenaustauscher DEAE-Cellulose.

3. Chromatographische Auftrennung mit dem Anionenaustauscher DEAE - Cellulose

Wir versuchten Trennungen mit 6 Digests aus einem γ -Globulin-Pool und mit 2 Digests von γ -Globulin aus Einzelseren. In vier Versuchen wurden 30 x 1,5 cm Säulen verwendet. Wir beobachteten regelmäßig das Erscheinen eines schmalbasigen und hohen Peaks, der sehr schnell im Eluat erschien und zwei bis drei kleinere Peaks, die nach Einsetzen des Gradienten eluiert wurden. Peak I enthielt in vier Versuchen konstant 85 - 90 % des gesamten eluierten Proteins. Die immunoelektrophoretische Auftrennung der Fraktionen der einzelnen Peaks zeigte, daß diese zwar ebenfalls noch heterogen waren, daß der erst eluierte Peak jedoch hauptsächlich aus einer S Komponente bestand und die später eluierten Peaks weit mehr F Komponenten enthielten als S Komponenten. Durch Verwendung von 35 x 2,5 cm Säulen erreichten wir eine noch bessere Auftrennung. (Abb. 6) In der Regel konnten vier Peaks eluiert werden. Das Material des ersten Peaks wurde nicht stark an die Cellulose gebunden und erschien bereits nach einem Durchflußvolumen von 60 - 70 ml. Peak I besaß immer hohe Extinktionswerte und war von den anderen Peaks scharf getrennt. Sein absteigender Schenkel zeigte im Gegensatz zum aufsteigenden in den meisten Fällen keinen gleichmäßigen Verlauf, sondern eine mehr oder minder ausgeprägte Schulter. Es war dies schon ein Hinweis auf mangelnde Homogenität. Wir konnten aber selbst in den Fällen, in denen wir auf Grund eines symmetrischen Peaks auf große Homogenität schlossen, eine immunologische Heterogenität beobachten. Mit dem Anstieg des Konzentrationsgradienten

wurde der Peak II eluiert. Er war von den folgenden Peaks nicht so scharf abgetrennt wie vom Peak I. Außerdem besaßen Peak II, III und IV immer weit niedrigere Extinktionswerte als Peak I. Peak I enthielt 70 - 80 % des gesamten eluierten Proteins. Zwischen dem Auftreten der Peaks im Eluat und der Ionenkonzentration des Eluats konnten wir eine Abhängigkeit beobachten. So wurde Peak II regelmäßig bei 32×10^{-4} Siemens ($= 4,7 \times 10^{-4}$), Peak III₄ bei 50×10^{-4} Siemens ($= 6,5 \times 10^{-4}$) und Peak IV bei 75×10^{-4} Siemens ($= 3,5 \times 10^{-4}$) eluiert. In zwei Fällen von Mischserum konnten wir eine Spaltung des Peak IV beobachten. Ob diese Spaltung zufällig ist, wurde von uns nicht weiter untersucht. Bei Einzelseren wurde diese Spaltung nicht beobachtet. Bei der immunoelektrophoretischen Identifizierung der Peaks zeigte sich, daß der aufsteigende Schenkel des Peak I aus dem S Fragment besteht. Im Ouchterlony konnte jedoch eine zweite schwache Präzipitationslinie beobachtet werden. Diese zweite Präzipitationslinie konnte verursacht sein durch nicht degradiertes γ G-Globulin oder durch eine 3,5 S Komponente, die zwar ähnliche chromatographische Eigenschaften besitzt wie das S Fragment, aber andere Antigen determinanten aufweist. Der absteigende Schenkel bestand aus einer Präzipitationslinie, die mit S identisch war und einer starken Linie im Bereich der Überschneidung von F und S. Diese Sonderpräzipitationslinie war immunologisch identisch mit der schwachen Sonderpräzipitationslinie des aufsteigenden Schenkels und dem später isolierten reinen F Fragment. Wurde Peak I mit Sephadex DEAE A 50 Medium rechromatographiert, so konnten diese Komponenten voneinander getrennt werden. (Abb. 7) Peak II, III und IV enthielten Komponenten mit schnellerer elektrophoretischer Beweglichkeit, die jedoch nicht identisch waren. Im Ouchterlony waren diese Peaks stets aus F und S Komponenten zusammengesetzt. Die oben beschriebene Aufspaltung des Peak IV fand auch Ausdruck in einer geringen Differenz der elektrophoretischen Beweglichkeit. Der später eluierte Anteil war etwas mehr zur Kathode verschoben. Da die Heterogenität vor allem des Peak I, II und III auch durch Chromatographie mit DEAE-Cellulose nicht beseitigt werden konnte, versuchten wir eine Auftrennung mit DEAE-Sephadex A 50 Medium. Dieser Anionenaustauscher besitzt eine durchschnittlich 6 mal größere Austauscherkapazität als DEAE-Cellulose, sodaß eine bessere Auftrennung zu erwarten war.

4. Chromatographische Auftrennung mit dem Anionenaustauscher DEAE-Sephadex A 50 Medium

Zu dem Zeitpunkt, als wir unsere experimentellen Arbeiten durchführten, war über die Verwendung von DEAE-Sephadex zur Auftrennung des Papain Digests nichts bekannt. Um optimale Trennbedingungen zu erhalten, mußten einige Schwierigkeiten, die in der Natur dieses Austauschers begründet sind, überwunden werden. Um eine gute Durchflußrate zu erhalten, verwendeten wir Pharmacia-säulen mit einer Schichtdicke von 3 cm. Zu starkes Zusammensintern wurde dadurch verhindert, daß wir nur mit ganz geringem hydrostatischem Schichtungsdruck arbeiteten. Eine starke Quellung wurde vermieden durch Verwendung von Tris-HCl Puffer mit einer Konzentration über 0,05 M. 7 Digests von γ -Globulin aus Einzelseren wurden auf diese Weise getrennt. Mit unseren Elutionsbedingungen erhielten wir stets vier Peaks, die gut vonein-

ander getrennt waren. (Abb. 8) Peak I wurde von DEAE-Sephadex noch weniger adsorbiert als von DEAE-Cellulose. Peak I entsprach immer dem Bild einer Gauß'schen Verteilungskurve, so daß größere Homogenität zu erwarten war. Nach Einsetzen des Konzentrationsgradienten wurden auch Peak II, III und IV eluiert. Auch hier war das Erscheinen der Peaks abhängig von der Ionenstärke des Eluates. So erschien Peak II bei $32,5 \times 10^{-4}$ Siemens ($= 2,5 \times 10^{-4}$), Peak III bei $53,4 \times 10^{-4}$ Siemens ($= 4,4 \times 10^{-4}$) und Peak IV bei 69×10^{-4} Siemens ($= 6,8 \times 10^{-4}$). Das Größen- und Mengenverhältnis der einzelnen Peaks zueinander war sehr variabel. So betrug die Variationsbreite des Peak I 40 % im Verhältnis zur Summe der anderen Peaks. Bei Peak II und III war die Variationsbreite noch größer. Nur bei Peak IV war die Variationsbreite sehr gering. Er enthielt 3 % des gesamten eluierten Materials ($= 0,5$). Die immunoelektrophoretischen Untersuchungen zeigten, daß Peak I und Peak IV sehr homogen waren. Peak I enthielt das S Fragment. (Abb. 9 b) Die S Komponente des aufsteigenden Schenkels war mehr zur Anode verschoben und die S Komponente des absteigenden Schenkels mehr zur Kathode. In Peak IV konnten wir stets die schnelle Komponente des Digests, das F Fragment identifizieren. (Abb. 9 e) Peak II und III waren dagegen sehr heterogen. Die Beweglichkeit dieser Komponenten lag im Bereich der Überkreuzung der S und F Fragmente. Im Agar stellte sich entweder eine einzelne Linie dar mit diffusen Konturen (Abb. 9 d) oder es waren zwei Präzipitationslinien sichtbar, deren eine mehr zur Anode und zum Antiserumdepot verschoben war. (Abb. 9 c) Die beiden Komponenten, die mit Peak II isoliert wurden, besaßen langsamere Beweglichkeit als die Komponenten, die mit Peak III eluiert wurden. Auch die Rechromatographie des Peak I und des Peak IV bewies die relativ große Homogenität. Vor der weiteren Untersuchung wurden die Fraktionen der einzelnen Peaks zusammengossen und mit Polyäthylenglycol eingengt.

5. Ultrazentrifugenerhebungen

Wie schon berichtet, sedimentiert papaindegradiertes γ -Globulin wesentlich langsamer als nicht degradiertes γ -Globulin mit einem Sed.Koeff. $S_{20w} = 3,5$ S. Eine schneller oder langsamer sedimentierende Komponente konnte nicht beobachtet werden. (Abb. 10 b) Auch die mit Peak I eluierten S Fragmente und die mit Peak IV eluierten F Fragmente sedimentierten als homogene Fraktionen. Für das S Fragment bestimmten wir einen Sed.Koeff. $= 3,27$ und für das F Fragment einen Sed.Koeff. $= 3,34$. (Abb. 10 c,d) Wegen der einheitlichen Sedimentation des Digests untersuchten wir Peak II und III nicht, da diese Fragmente in der gleichen Größenordnung liegen müssen.

6. Antigenstruktur

Immunoelektrophoretisch konnten im γ -Globulin-Digest immer zwei sich überkreuzende Komponenten festgestellt werden, eine langsame Komponente S (slow nach der Nomenklatur von Edelman) und eine schnelle Komponente F (fast). Wie Abbildung 9 a zeigt, kann eine Kreuzung der S und F Komponenten immunoelektrophoretisch nicht immer sicher identifiziert werden. In diesem Fall scheint es, daß S und F mit einer Komponente mittlerer Beweglichkeit eine Teilidentität besitzen. Dies konnte auch von

Edelman et al ¹⁰ beobachtet werden. Bessere Aufklärung über das antigene Verhalten der auf Sephadex DEAE-Cellulose isolierten Fragmente konnte durch die Agardoppeldiffusion nach Ouchterlony erzielt werden.

Die S - Fraktion von Peak I ergibt eine einzelne Linie, die mit der γ G-Globulinlinie fusioniert. (Abb. 11) Die γ G-Globulinlinie bildet jedoch einen Sporn, der nicht vom geradlinigen Verlauf abweicht. Das nichtdegradierte Molekül muß also Antigen determinanten besitzen, die nicht mehr auf dem S - Fragment lokalisiert sind. Kommt es nicht zu einer vollen Identität, so müssen verschiedene Determinanten auf verschiedenen Orten des Gesamt moleküls verteilt sein. Eine andere Erklärung wäre die, daß durch die enzymatische Behandlung bestimmte Antigen determinanten zerstört werden oder Antigen determinanten durch Peptidabspaltung verloren gehen.

Das F - Fragment ergibt einen ähnlichen Befund. Die γ G-Globulinlinie bildet auch hier einen Sporn, der nicht vom geradlinigen Verlauf abweicht. Das F - Fragment besitzt also ebenfalls nur Teilidentität. (Abb. 11) Abbildung 12 zeigt einen Vergleich der S - mit der F - Komponente. Beide überkreuzen sich völlig, ohne von ihrem geradlinigen Verlauf abzuweichen. Auf dem S - Fragment befinden sich also Antigen determinanten, die auf dem F - Fragment nicht vorhanden sind und umgekehrt. Dieser Befund spricht dafür, daß auf dem Gesamt molekül verschiedene Antigen determinanten an verschiedenen Orten lokalisiert sind, die durch die Spaltung getrennt werden. Wie kommt es nun zur Ausbildung eines Sporns? Sind die Antigen bindenden Potenzen des Antikörpers alle auf einem Molekül lokalisiert, so müßte man annehmen, daß die Präzipitationslinie des relativ schnell diffundierenden S - bzw. F - Fragments eine Demarkationslinie darstellt, an der alle Antikörper abgefangen werden. Erst nachdem der größte Teil des S - bzw. des F - Fragments präzipitiert wäre, könnte genügend Antikörper weiterdiffundieren, um mit dem intakten γ G-Globulinmolekül zu reagieren. In diesem Fall würde es aber sicher zu einer Abschwächung und einer Krümmung des Sporns kommen. Beides war nie der Fall. Sehr wahrscheinlich ist die Annahme, daß das Antiserum Antikörper gegen γ G-Globulin besitzt, die sich in ihrer Spezifität unterscheiden.

Einen weiteren Beweis dafür, daß F - und S Fragmente antigenetisch nicht identisch sind und daß keine Antigen determinanten verloren gegangen sind, liefert Abbildung 12. Peak II und Peak III bilden zwei Linien im Agar. Jeweils die innere, die etwas stärker ausgebildet ist als die äußere, gibt mit der γ G-Globulinlinie nur eine Teilidentität, während die äußere, schwächere Linie eine Vollidentität erbit. Die innere Linie des Peak III fusioniert völlig mit dem F - Fragment; die innere Linie des Peak II fusioniert völlig mit dem S - Fragment. Vergleicht man Peak III mit S - Fragment, das mit Peak I isoliert wurde, so beobachtet man, daß die zweite Komponente, die mit γ G-Globulin in Abbildung 11 eine volle Identität besitzt, auch eine Vollidentität mit S - Fragment ergibt. In Peak II entspricht die mit γ G-Globulin in Abbildung 11 eine scheinbare Identität ergebende Komponente antigenetisch dem S - Fragment. Die beiden Peaks II und III enthalten wohl Protein unterschiedlicher elektrophoretischer Beweglichkeit, wir konnten jedoch keine Antigen determinanten entdecken, die nicht im reinen S - Fragment des Peak I

oder im F - Fragment des Peak IV enthalten sind. Peak II und III sind also aus Bruchstücken zusammengesetzt, die das gleiche Antigendeterminantenmuster enthalten wie S und F.

Mit der Annahme, daß S und F spezifischere Antikörper gegen γ G-Globulin vorkommen, kann man sich auch die obenbeschriebene Vollidentität einer Komponente des Peak II oder III mit γ G-Globulin erklären.

Durch die enzymatische Degradation mit Papain gehen keine Antigendeterminanten verloren. Außerdem werden zwei antigenetisch völlig verschiedene Fragmente produziert. Zwischen den Befunden mit Mischseren und Einzelseren konnten keine Unterschiede entdeckt werden.

II. Degradation von γ G-Paraprotein

1. Fälle

Wir untersuchten drei Paraproteine vom γ G-Typ, die von Patienten mit klinisch gesichertem Multiplen Myelom stammten. Die Paraproteine vom Fall Zo (Vers. XXII, XXVII) und Ba (XXVI) besaßen α_2 Beweglichkeit und das Paraprotein vom Fall Po (XXV) α_2 Beweglichkeit. Im Fall Zo konnten durch Ionenaustauscherchromatographie der normale γ G-Globulinanteil vom pathologischen Anteil in solcher Menge isoliert werden, daß die mit Papain-spaltung gewonnenen Fragmente miteinander verglichen werden konnten. Die bei der Degradation und der nachfolgenden Auftrennung verwendeten Methoden waren die gleichen wie sie für normales γ G-Globulin schon beschrieben wurden.

a) Fall Zo (XXI, XXII, XXVII)

Durch Chromatographie des Vollserums mit DEAE-Cellulose gelang es, im γ G-Bereich zwei scharf getrennte Peaks zu eluieren. Der zuerst eluierte Peak mit geringer Eiweißkonzentration entsprach dem normalen Anteil des γ G-Globulins und der darnach eluierte Peak von hoher Eiweißkonzentration dem pathologischen Anteil. Beide Anteile wurden getrennt voneinander mit Papain degradiert. Das Sephadex G 25 Chromatogramm war identisch mit dem früher beschriebenen G 25 Chromatogramm des normalen γ G-Globulins, sowie mit dem G 25 Chromatogramm des Digests des isolierten normalen Anteils. Auch in der Ultrazentrifuge sedimentierte das degradierte pathologische Globulin mit der gleichen Geschwindigkeit wie sie für degradiertes normales γ G-Globulin beschrieben wurde. Immunelektrophoretisch konnten im Digest des normalen und des pathologischen Anteils zwei Linien festgestellt werden. Das Digest des normalen Anteils besteht aus einer flach ausgezogenen Linie mit S Beweglichkeit und einer flach ausgezogenen Linie mit F Beweglichkeit. (ABB. 13 a) Beide Linien überkreuzen sich gerade noch. Die Überkreuzung ist jedoch nicht so ausgeprägt, wie wir sie bei den beschriebenen normalen Digests immer beobachteten.

Auffällig unterscheidet sich davon das Digest des pathologischen Anteils. Die Komponente mit schnellerer Beweglichkeit und die Komponente mit langsamerer Beweglichkeit überkreuzen sich so, daß der langsamere Anteil des schneller wandernden Fragments fast dieselbe Beweglichkeit besitzt wie der langsame Anteil des Fragmentes mit langsamerer Beweglichkeit. Außerdem zeigt die schnellere Komponente zwei Ausbuchtungen zur Antise-

rumrille in Form eines flachen w. (Abb. 13 c)

Chromatographische Auftrennung des Digests

1. Normaler Anteil (Abb. 14)

Es wurden drei Peaks eluiert. Der erste, der vor Einsetzen des Gradienten erschien, war schmalbasig und sehr gut isoliert. Nach Einsetzen des Gradienten wurden die beiden anderen Peaks eluiert, die nicht scharf voneinander getrennt waren. Im Gegensatz zu Peak I war Peak III breitbasig und von hoher Extinktion, besaß jedoch einen geringeren Eiweißgehalt als Peak I. Immuno-elektrophoretisch konnte in Peak I die Fraktion mit S Beweglichkeit nachgewiesen werden. (Abb. 13 b) Peak II bestand aus zwei Komponenten, die der Überkreuzung der S und F Linie entsprachen und Peak III enthielt die F Komponente. (Abb. 13 b)

2. Pathologischer Anteil

Unabhängig voneinander wurden zwei Digests mit DEAE-Sephadex chromatographiert. In Versuch XXII war die Chromatographie kontinuierlich. In Versuch XXVII wurde diskontinuierlich eluiert. Zwischen dem Chromatogramm (XXII) des pathologischen und des normalen Digests (XXI) besteht eine Ähnlichkeit. Auch hier wurden drei Peaks eluiert. Peak I (14-19) ist schmalbasig und scharf abgetrennt von den nach Einsetzen des Gradienten eluierten Peak II und III. (Abb. 14) Die immuno-elektrophoretische Untersuchung der einzelnen Peaks ergab jedoch eine Abweichung von den gewohnten Ergebnissen mit normalem Digest. So war das Material des Peak I weder der S noch der F Komponente des Digests immuno-elektrophoretisch mit Sicherheit zuzuordnen. (Abb. 13 d) Der aufsteigende Schenkel des Peak II (32-35) bestand aus Material mit der Beweglichkeit des schnelleren Anteils der F - Komponente. (Abb. 13 e) Im absteigenden Schenkel des Peak II (35-38) und in Peak III konnten zwei sich überkreuzende Komponenten identifiziert werden. Die langsamer wandernde Komponente hatte dieselbe Beweglichkeit wie das Material des Peak I. (Abb. 13 f) Die Elutionsfolge dieser Fragmente konnte auch in Versuch XXVII beobachtet werden, obwohl das Chromatogramm durch die diskontinuierliche Gradientenelution einen anderen Verlauf nahm.

b) Fall Ba (XXVI)

Das γ -G-Paraprotein Ba, das wie in Fall Zo von dem normalen Anteil abgetrennt werden konnte, wurde 16 Stunden wie sonst mit Papain incubiert. (siehe Methode) Das Sephadex G 25 Chromatogramm glich dem in Abbildung 1. Der Anteil der abfälligen Peptide betrug 18 %. In der Ultrazentrifuge sedimentierte das gesamte Digest einheitlich mit dem charakteristischen Sed. Koeff. um 3,5 S. In der Immuno-elektrophorese konnte jedoch ein abweichendes Bild festgestellt werden. Wir konnten nur eine ausgezogene Linie beobachten, die zwei Ausbuchtungen in Richtung Antiserumrille besitzt. Eine zweite Linie, die sich mit dieser Linie überkreuzt, konnte in keinem Ansatz erhalten werden. (Abb. 15 a) Wie ein Vergleich mit Abbildung 13 c zeigt, weist diese Linie eine gewisse Ähnlichkeit auf mit der schneller wandernden Komponente von Zo path. Der normale Anteil des γ -G-Globulins konnte nicht untersucht werden, da er in zu geringer Konzentration vorlag.

Chromatographische Auftrennung des Digests

Das Digest wurde mit kontinuierlicher Gradientenelution chromatographiert. Wie im Fall Zo path. wurde mit Einsetzen des Konzentrationsgradienten der erste Peak eluiert, der von dem kurz darauf erscheinenden zweiten Peak kaum abgetrennt war. Der Eiweißgehalt dieser beiden Peaks betrug 80 % des aufgetragenen Materials, sodaß bei dem von uns beobachteten Verlust von 20 % - 25 % kein weiterer Peak zu erwarten war.

Bei der immunoelektrophoretischen Identifizierung zeigte der aufsteigende Schenkel des ersten Peaks eine Komponente mit der Beweglichkeit des langsamen Anteils des Digests. (Abb. 15 b) Die Spitze des Peak II und dessen absteigender Schenkel (Abb. 15 c) enthielten Fragmente von etwas schnellerer Beweglichkeit. Andere Komponenten konnten nicht entdeckt werden.

c) Fall Porg (XXV)

Im Fall Porg stand ein Paraprotein zur Verfügung, das α_2 -Beweglichkeit besitzt (Abb. 16 a), jedoch zu den γ G-Paraproteinen zu zählen ist. Diese antigenetische Zugehörigkeit konnte im Ouchterlony-Test, im Osmerantest und in der Immunoelektrophorese bewiesen werden. In allen drei Tests konnte außerdem beobachtet werden, daß das normale γ G-Globulin des Pat. einen Sporn bildet, den wir in den oben beschriebenen Fällen nicht beobachten konnten. (Abb. 20) Der Sed.Koeff. dieses α_2 -Paraproteins konnte zu $S_{20w} = 7,14$ S bestimmt werden. Nach chromatographischer Auftrennung des Paraproteins wurde dieses 16 Stunden (0,01 m Na-Phosphatpuffer pH 6,0) mit Papain inkubiert. Nach Inkubation betrug der Sed.Koeff. des Digests $S_{20w} = 3,8$ S. Die Umwandlung war vollständig. (Abb. 10 e) Das Sephadex G 25 Chromatogramm war identisch mit den schon beschriebenen. Eine Abweichung trat nicht auf. Der Peptidanteil betrug 20 % des Ausgangsmaterials. Immunoelektrophoretisch bestand das Digest aus einer einzigen, gleichmäßig gekrümmten Linie, von gleicher Beweglichkeit wie das Ausgangsmaterial. (Abb. 16 b)

Chromatographische Auftrennung des Digests

Durch kontinuierliche Gradientenelution konnte nur ein einziger breitbasiger Peak eluiert werden, der erst nach einem Durchlaufvolumen von 180 ml, lange nach Einsetzen des Konzentrationsgradienten, erschien. (Leitfähigkeit 50×10^{-4} 1/n) Das Gesamteiweiß des Peaks betrug 70 % des aufgetragenen Digests. Immunoelektrophoretisch bestanden alle Fraktionen dieses Peaks aus einer einzigen Komponente, deren Beweglichkeit und Präzipitationslinie identisch ist mit der des Digests und des α_2 -Paraproteins. Eine andere Komponente konnten wir nicht beobachten. (Abb. 16 c)

2. Antigenstruktur

Wie schon beschrieben, werden heute die Myelomproteine eingeteilt in die Antigentypen I und II (114,115,116,117,118). Ein isoliertes Paraprotein besitzt deshalb mit normalem γ G-Globulin gegen Anti- γ G nur eine Teilidentität, da der normale Anteil ja aus Trägern beider Determinantentypen zusammengesetzt ist. In unserem Untersuchungsgut konnte nur in ganz wenigen

Fällen eine Spornbildung des normalen γ G-Globulins beobachtet werden, die dann nur sehr schwach ausgebildet war. Die Gründe für die scheinbare Vollidentität dürften wohl methodischen Ursprungs sein. Die untersuchten Fälle Zo und Ba besaßen Vollidentität, im Fall Porg konnte Teilidentität beobachtet werden (Abb. 20).

Wie berichtet, konnten die chromatographisch getrennten Fragmente der degradierten γ G-Paraproteine immunoelektrophoretisch nicht eindeutig definiert werden, da sich die Wanderungsbereiche der sich überkreuzenden Fragmente weitgehend überlappten und die Elutionsfolge der pathologischen Fragmente sich von der der normalen Fragmente unterschied. Abbildung 17 zeigt einen Vergleich der Peak I des normalen degradierten γ G-Globulins (Zo norm 5-9) und des degradierten pathologischen Paraproteins (Zo path 14-19). Zo norm 5-9 konnte immunoelektrophoretisch und immunologisch einwandfrei als S Fragment identifiziert werden. Im Ouchterlony zeigt sich noch eine schwache zweite Präzipitationslinie, die der F - Komponente entspricht. Die S - Komponente überkreuzt die Fraktion Zo path 14-19 völlig, die jedoch mit der schwachen Präzipitationslinie eine Identität ergibt. Der aufsteigende Schenkel von Peak II (Zo path 32-35) besteht nur aus einer Komponente, die mit dem normalen F - Fragment (Zo norm 32-35) eine volle Identität besitzt. (Abb. 19) Auch die in der Immunoelektrophorese sich überkreuzenden Komponenten des absteigenden Schenkels des Peak II und des Peak III konnten antigenetisch dem S - und dem F - Fragment zugeordnet werden. (Abb. 18)

Mit den von uns verwendeten Anti- γ G-Antisera konnten wir zwischen den homologen Fragmenten des normalen und pathologischen γ G-Globulins im Fall Zo bezüglich der Antigen determinanten keine Unterschiede feststellen. Da wir auf die Verwendung von Anti- γ G-Globulin-Antiserum angewiesen waren, schied die Entdeckung paraproteinspezifischer Antigen determinanten von vorne herein aus. Mit unserer Methode konnten wir nur einen Determinantenmangel auf den pathologischen Fragmenten entdecken. Auch im Fall Ba konnte im Antigen determinantensatz zwischen homologen pathologischen und normalen Fragmenten kein Unterschied festgestellt werden. Obwohl in der Immunoelektrophorese nur eine Präzipitationslinie sichtbar ist, konnten im Ouchterlony im Peak I zwei Präzipitationslinien beobachtet werden, die Träger von S und F Antigen determinanten sind.

Im Fall Porg dagegen konnten Unterschiede beobachtet werden. Abbildung 20 zeigt, daß das Paraprotein, das antigenetisch zu den γ G-Paraproteinen zu zählen ist, mit dem normalen Anteil (γ G-Porg) nur eine Teilidentität besitzt. Wenn wir nicht degradiertes α_2 -Paraprotein Porg mit S - Fragment verglichen, so konnten wir immer eine Überkreuzung der beiden Komponenten feststellen. Nach dem oben gesagten mußten wir annehmen, daß auf dem Paraprotein die normalen S - Determinanten fehlen, zum mindesten aber versteckt sind. Wenn wir dieses Paraprotein mit dem normalen F - Fragment verglichen, so konnten wir stets eine Vollidentität feststellen. (Abb. 21) Die Teilidentität des Paraproteins mit dem normalen γ G-Globulin wäre damit nicht in einer Zuordnung zu einem Antigentyp I oder II zu suchen, sondern in einem völligen Mangel an normalen S - Antigen determinanten.

Nach Degradation des γ -Paraproteins konnten wir das gleiche Verhalten beobachten. Das Digest zeigte ebenfalls mit F Vollidentität, mit γ -G-Globulin Teilidentität und mit S - Fragment überhaupt keine Identität. (Abb. 20) In Immunoelktrophorese und im Ouchterlonytest trat nur eine Präzipitationslinie auf. Auch die chromatographisch isolierten Fraktionen enthielten nur eine immunologisch faßbare Komponente, die völlig identisch ist mit dem nichtdegradierten Paraprotein und dem Digest. Da nach Degradation die Konfiguration der Moleküle geändert ist, müßte man annehmen, daß eine Blockierung von S - Determinanten aufgehoben wird, sodaß sie wenigstens teilweise immunologisch erfaßt werden könnten. Da dies nicht der Fall war, kann man das immunologische Verhalten des Paraproteins Porg. nur mit einem Mangel an normalen S - Antigen determinanten erklären.

3. DISKUSSION DER METHODEN

1. Enzymatische Degradation

Durch die enzymatische Degradation mit Pflanzenproteasen wie Bromelain, Ficin oder Papain werden, ebenso wie durch Reduktion der Disulfidbindungen, univalente Fragmente gewonnen, die noch Antigenbindungsfähigkeit besitzen, (152,151,153,154,156, 188,161,159,160,158,208,215) jedoch nicht mehr präzipitieren. Der große Vorteil dieser Methode gegenüber der Reduktion ist die große Stabilität der entstandenen Fragmente, die weder zur Aggregation noch zur Denaturierung neigen. Die Messung der Viskosität ergibt, daß sich die einzelnen Fragmente von Kaninchen- oder Human- γ -G-Globulin wie globuläre Proteine verhalten, (216) sodaß eine feste Konfiguration besteht. Die Änderung der Viskosität nach Degradation ist sehr gering. (Nisonoff et al. 217) Auch die minimale Änderung der optischen Drehung von 54° auf 56° spricht für die geringe Entfaltung des Proteins. Trotz offensichtlich geringer Beeinflussung des sterischen Aufbaus durch die Papainspaltung scheint sich die Beobachtung, daß die Bindungskapazität von Kaninchen-Antikörpern nicht vermindert wird, (217,161,218) nicht zu bestätigen. Der berichtete Verlust soll 40 % betragen und vom Enzym-Substratverhältnis unabhängig sein.

Die Nachteile der Methode liegen darin, daß als Nebenprodukt der enzymatischen Spaltung 10 - 20 % des Ausgangsmaterials in Form von Peptiden anfällt, Papain ein relativ unspezifisches Ferment ist und der Ort des enzymatischen Angriffs erst identifiziert werden muß, da eine oder mehrere Peptidbindungen von ungefähr 1300 gespalten werden kann, während durch Reduktion nur Disulfidbindungen gespalten werden. Daneben ist die Auftrennung von Fragmenten mit homologen Antigen determinanten schwierig, vor allem im Fall des Human- γ -G-Globulins. Die gewonnen physico-chemischen Daten (vor allem Aminosäurenuntersuchungen) müssen mit großer Kritik aufgenommen werden. Ein Drittel des Kohlenhydratgehaltes des gesamten Moleküls wird abgespalten. (15)

Trotz dieser Nachteile stellt die Papainspaltung eine wertvolle Methode dar, selbst wenn man diese Nachteile in Kauf nehmen und die Ergebnisse mit großer Kritik betrachten muß. In letzter Zeit scheint sich auch der Ort des enzymatischen Angriffs näher definieren zu lassen.

Von verschiedenen Arbeitsgruppen wurden im wesentlichen übereinstimmende Degradationsbedingungen verwendet. Nach der Definition von Michaelis und Menten ist die Geschwindigkeit der Gesamtreaktion abhängig vom Enzym-Substratverhältnis. Bei geringem Enzym-Substratverhältnis verläuft die Umwandlung in 3,5 S Komponenten sehr langsam, bei einem hohen Verhältnis nimmt die Reaktionsgeschwindigkeit zu, mit ihr jedoch auch die Zahl der abgespaltenen Peptide. (156) Nach dem von Porter angegebenen Verhältnis Enzym : Substrat = 1 : 100 sind nach Putnam in 15 Minuten 66 % Kaninchen- γ G-Globulin unter geringer Freisetzung von Peptiden gespalten. Dieses Verhältnis scheint optimal zu sein.

Das pH Optimum des kristallisierten Papains in Gegenwart von Cystein und EDTA wird von Kimmel und Smith zwischen pH 5,0 und 7,5 angegeben. Ein spezifischer Ioneneffekt des verwendeten Puffers wurde in Gegenwart von Aktivatoren nicht beobachtet. (196,163) Nach den Befunden von Putnam et al. ist jedoch in einem pH - Bereich über 6,5 selbst nach langer Inkubationszeit die Umwandlung in 3,5 S Fragmente unvollständig. Wir inkubierten in einer Reihe von Versuchen bei pH 7,6 und konnten bis auf einen Fall stets eine Umwandlung in 3,5 S Fragmente beobachten, wie die Ultrazentrifugenuntersuchung erwies. Eine Überprüfung mit der empfindlicheren Stärkegelelektrophorese wurde nicht durchgeführt, sodaß geringe Reste von 6,6 S Komponenten sich der Beobachtung entzogen. In dem einen Fall, in dem keine komplette Umwandlung erfolgt war, wurde die nichtdegradierte Komponente auffällig spät eluiert. (Peak III Bar). Bei pH 6,0 liegt nach Putnam das pH - Optimum. In einer Anzahl von Versuchen inkubierten wir bei pH 6,0, konnten jedoch gegenüber pH 7,6 außer einer etwas stärkeren Peptidfreisetzung keinen Unterschied bemerken. Eine Inkubationszeit von 16 - 18 Stunden scheint auch nach unseren Erfahrungen genügend zu sein. Auch die Peptidfreisetzung nähert sich hier einem konstanten Wert.

Über die Verwendung von Aktivatoren zur Erreichung voller Enzymaktivität wurde bereits berichtet. Cebra et al. konnten die Spaltung in zwei Schritte auflösen. Durch Zugabe von nichtaktiviertem Papain zu γ G-Globulin (Kaninchen) fand eine "begrenzte Proteolyse" statt, die zu keiner Änderung der Sedimentationsverhältnisse führte. Wurde daraufhin Papain entfernt und Cystein zugegeben, so wurde das enzymatisch vorbehandelte Protein in 3,5 S - Fragmente gespalten. Dieser Mechanismus würde der schon beschriebenen Pepsinbehandlung mit nachfolgender Reduktion von einer Disulfidbindung gleichen. Wir konnten dagegen eine Fragmentation in 3,5 S - Fragmente erreichen durch Zugabe von nichtaktiviertem, kristallisiertem Mercuri-Papain (Inkubationszeit 12 Stunden)(Beobachtet auch von Putnam und Deutsch et al.) Dies schließt jedoch einen Angriff an zwei verschiedenen Orten durch zwei unterschiedliche Reaktionstypen nicht aus, da Papain sowohl proteolytisch wirken kann wie auch reduktiv. Ob unsere Enzympräparation durch Sulfhydryl-Aktivatoren verunreinigt war und in wieweit die Präparation von Cebra enzymfrei war, kann von uns nicht beantwortet werden. Die Verwendung geringer Cysteinkonzentrationen ist notwendig, um eine Präzipitation von PCMB zu verhindern.

2. Trennungsmethoden

a) Peptidabtrennung

Über die unvollständige Abtrennung der Peptide durch Dialyse wurde berichtet. Die Verwendung von Sephadex G 25 fine brachte wesentliche Vorteile. Erstens konnte eine vollständige Trennung der hochmolekularen Komponente von der Peptidkomponente erreicht werden. Zweitens konnte dadurch die Trennzeit, die bei der Dialyse ein bis zwei Tage benötigt, auf wenige Stunden zusammengedrängt werden. Drittens werden die Peptide in drei Fraktionen aufgeteilt und bei geeignetem Säulenvolumen relativ konzentriert eluiert. Viertens werden die Aktivatoren, Inhibitoren und Antiseptica abgetrennt, sodaß eine zusätzliche Inaktivierung des Papains erfolgt, fünftens kann gleichzeitig in jeden beliebigen Puffer umgepuffert werden.

Da der Kd-Wert für die hochmolekulare Komponente 0 ist, war das Separationsvolumen des Salzes bei unserer Säulenpackung so groß, daß die ersten drei Peaks vollständig umgepuffert wurden. ($V_i = 80$ ml) Das aufgetragene Probevolumen war wesentlich geringer als die Separationsvolumina. Auch die Durchflußgeschwindigkeit war so gewählt, daß der Austausch zwischen äußerer und innerer Phase optimal war, sodaß eine scharfe Trennung der Zonen erfolgte, wie das Chromatogramm zeigt.

Die Auftrennung der Peptide in drei Zonen erfolgt auf Grund verschiedener Kd-Werte. So liegen die Werte für Peak II und III zwischen 0 und 1 und zwar für Peak II bei $K_d = 0,4 - 0,5$ und Peak III bei $K_d = 0,8 - 0,9$. Diese Werte sprechen dafür, daß die Peptide der einzelnen Zonen sich in ihrer molekularen Größe voneinander unterscheiden, da sie in unterschiedlicher Weise in die stationäre Phase eindringen. Das Molekulargewicht wäre von II nach IV sinkend. Außer der Molekülgröße spielen für den Austausch zwischen äußerer und innerer Phase, d. h. für das Diffusionsgleichgewicht spezifische Stoffkonstanten eine Rolle, da wir für Peak IV einen Kd - Wert über 1 fanden. Dafür spricht auch, daß sich bestimmte Aminosäuren in ihren Kd - Werten unterscheiden. Auch Hsiao et al. konnten zwei Peptid-Peaks auf G 25 trennen, die sich in ihrer Größe voneinander unterscheiden. Die quantitative Aminosäurezusammensetzung des Peptidgemisches und der 3,5 S Komponente unterschied sich nur gering. Größer waren dagegen die Unterschiede zwischen den einzelnen Peptidfraktionen. Gitlin et al. konnten S-Fragmente (Kaninchen) mit Chymotrypsin in 35 differenzierbare Peptide spalten und F (III) in 55 - 60 Peptide. Die Peptide wurden reproduzierbar erhalten. Es scheint nicht, daß die Peptide bei der Spaltung in 3,5 S Fragmente mit herausgebrochen werden. Wahrscheinlicher ist, daß ein gewisser Teil der γ G-Globuline in leicht denaturiertem Zustand schon vor der Degradation vorliegt und damit der Papainspaltung voll zugänglich ist.

b) Trennung der 3,5 S Fragmente

1. Carboxymethyl-Cellulose

Die Auftrennung von Kaninchen- γ G-Globulindigest mit CM-Cellulose in drei Peaks I, II und III wurde erstmals beschrieben von Porter^{151,152} und später bestätigt. (208,188,156,206,157,88) Nach der Nomenklatur von Edelman würde I und II dem S - Frag-

ment entsprechen und III dem F-Fragment. Wurde früher geglaubt, daß I und II, die sich nur geringfügig voneinander unterscheiden, aus einem Molekül stammen, so konnte von Palmer et al. einwandfrei nachgewiesen werden, daß sie von verschiedenen Globulinmolekülen stammen, die durch Chromatographie mit CM-Cellulose voneinander getrennt werden können. Diejenige Globulinfraktion, die zuerst eluiert wird, besitzt Fragment I und III und diejenige, die zuletzt eluiert wird, besitzt Fragment II und III.

Obwohl auch die Auftrennung von Human- γ G-Digest beschrieben wurde (61,162), konnten wir keine Auftrennung in S- und F-Fragmente erreichen. Trotz wiederholter Rechromatographie der eluierten Peaks enthielten diese S- und F-Komponenten. Wir konnten jedoch beobachten, daß die S- und F-Komponenten der einzelnen Peaks sich in ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit voneinander unterscheiden. Auch hier scheinen wie beim Kaninchen- γ G-Globulin verschiedene Moleküle verschiedene S-Komponenten mit gleichem Antigen-determinantensatz zu besitzen. Abweichend ist jedoch das Verhalten der F-Fragmente (analog III). Da die Komponente mit mittlerer Beweglichkeit aus S- und F-Fragmenten besteht, deren chromatographisches Verhalten sehr ähnlich ist, dürften sich einzelne Moleküle auch in ihren F-Fragmenten unterscheiden. F-Fragment von Kaninchen- γ G-Globulin konnte dagegen chromatographisch nicht in verschiedene Fraktionen getrennt werden. Mangelnde Auftrennung mit CM-Cellulose wurde auch von Franklin und Mitarbeitern (113,160,159,161,164) beschrieben.

2. DEAE - Cellulose

Die Verwendung eines Anionenaustauschers zur Trennung brachte einen großen Fortschritt. Edelman et al. (113) konnten zwei Peaks eluieren; der erste Peak schmalbasig, von hoher Extinktion und im wesentlichen aus S bestehend, (gering verunreinigt durch F) der zweite Peak breitbasig, aus F und in geringerem Maße aus S bestehend. Durch Rechromatographie konnte er den zweiten Peak noch einmal in II r und III r auflösen. Die Beweglichkeit von II r lag zwischen I und III r. Wir konnten ohne Rechromatographie das Digest in mindestens vier gutgetrennte Peaks auflösen. Der Anteil an Trägermolekülen mit S-Antigen-determinanten nahm nach IV zu und der Anteil an Trägermolekülen mit F-Antigen-determinanten nach I zu stark ab. I und IV waren jedoch antigenetisch nicht homogen. Wie bei der Chromatographie mit CM-Cellulose kann auch hier eine Trennung von Fragmenten beobachtet werden, die zwar gleiche Antigen-determinanten besitzen, sich aber in ihrer Affinität zum Ionenaustauscher und in ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit voneinander unterscheiden. Es ist offensichtlich, daß die Trennung keine zufällige ist. Auch von Franklin (159,160) wurde eine Auftrennung mit DEAE-Cellulose beschrieben. Ein direkter Vergleich der Chromatogramme ist jedoch schlecht möglich, da vorher mit CM-Cellulose getrennt wurde. Franklin konnte drei Peaks eluieren, A, B und C. Nach ihrem immunoelektrophoretischen und immunologischen Verhalten entspricht A = S, C = S, B = S und F. A besitzt schnellere Beweglichkeit als C. Stolsky und Fudenberg (161) fanden, daß die γ G-Globulin-Unterfraktion mit dem saureren IP vor allem A-Fragment enthält und wenig C und diejenige Fraktion mit dem basischeren IP hauptsächlich C und wenig A. Zwischen diesen beiden Extremen

herrschen fließende Übergänge. Dieses Verhalten gilt sowohl für die stärkegelelektrophoretisch wie auch für die chromatographisch getrennten, sich entsprechenden Unterfraktionen. Auch Edelman et al. (1955) konnten bestätigen, daß schnell wandernde Unterfraktionen schnelle S - Fragmente besitzen und umgekehrt. In keinem Fall wurden jedoch verschieden schnell wandernde F - Fragmente beschrieben.

Unsere chromatographischen Auftrennungen mit DEAE-Cellulose erzielten reproduzierbar verschieden schnell wandernde F - Fraktionen. Um einen experimentellen Irrtum auszuschließen, rechromatographierten wir einen Peak I, der Verunreinigungen der S - Komponente mit F - Fragmenten aufwies, auf DEAE-Cellulose unter den gleichen Bedingungen. Durch sehr geringes Separationsvolumen getrennt, wurden zwei Peaks eluiert. Der erste bestand aus S - Fragment, der zweite aus F - Fragment, wie im Ouchterlony gezeigt werden konnte. Dieses F - Fragment unterschied sich in seiner immunoelktrophoretischen Beweglichkeit und in seinem chromatographischen Verhalten eindeutig von dem F - Fragment, das mit Peak IV eluiert wurde. Durch Rechromatographie von Peak IV konnte dieser Unterschied bestätigt werden.

DEAE-Cellulose eignet sich also für die Auftrennung papainverdauter Fragmente in weit besserem Maße als CM-Cellulose. Daß die F - und S - Fragmente nicht eindeutig voneinander getrennt werden können, liegt daran, daß sich die Trägermoleküle homologer Determinanten in ihrem chromatographischen Verhalten voneinander unterscheiden und sich andererseits Trägermoleküle von S - Determinanten und von F - Determinanten in ihren chromatographischen Eigenschaften sehr ähneln.

3. DEAE - Sephadex

Der Trenneffekt mit DEAE-Sephadex war ähnlich dem der DEAE-Cellulose. Durch die wesentlich höhere Austauscherkapazität gelang es jedoch, die Separationsvolumina zu vergrößern, sodaß noch schärfere Trennungen erzielt wurden. Vor allem erwies sich Peak I als sehr homogen. Abbildung 22 vergleicht die mit DEAE-Cellulose und DEAE-Sephadex erreichten Trennungen der Peak I. Peak I der DEAE-Sephadex Trennung besteht fast nur aus S - Fragmenten. Auch mit DEAE-Sephadex konnten verschiedene Trägermoleküle homologer Antigendeterminanten voneinander getrennt werden. Der oben beschriebene Befund konnte bestätigt werden. Die Elutionsfolge der eluierten Zonen war in sämtlichen Versuchen reproduzierbar. Der einzige Nachteil dieser Methode ist, daß die Durchflußgeschwindigkeit während eines Versuches nicht konstant gehalten werden kann, da die Ionenkonzentration einen starken Einfluß auf den Quellungszustand der Cellulose besitzt. Der Einfluß auf das Chromatogramm scheint jedoch gering zu sein. Von Vorteil ist die Verwendung von Tris-HCl, da der Durchfluß konstanter wird. Papain wird dadurch zusätzlich inaktiviert. (196) Die Grenzen der immunologischen Methoden sind hinreichend bekannt, sodaß auf eine nähere Ausführung verzichtet werden kann.

4. DISKUSSION DER ERGEBNISSE

I. Normales γ G-Globulin

Wie oben beschrieben, können durch enzymatische Behandlung mit Papain unter geeigneten Methoden γ G-Globuline völlig in Bruchstücke mit einem Sed. Koeff. S_{20w} zwischen 3 und 4 S gespalten werden. Die Sed. Koeff. sind Schwankungen unterworfen, die durch Konzentrationsunterschiede bedingt sind. Die Konzentrationsabhängigkeit ist für S- und F-Fragmente spezifisch, extrapoliert auf 0 besitzen sie jedoch gleiche Sedimentationskonstanten. (155,216) Das Molekulargewicht für S ist nach neueren Untersuchungen 52 000 und für F 48 000. (216) Immunoelktrophoretisch konnten zwei sicher voneinander verschiedene Komponenten beobachtet werden. Die mit langsamerer Beweglichkeit wurde nach Edelman von uns mit S bezeichnet und die mit schnellerer Beweglichkeit mit F. Wie unsere Befunde zeigten, durfte mit dieser Bezeichnung nicht allein die elektrophoretische Beweglichkeit charakterisiert werden, sondern im wesentlichen der Antigen-determinantensatz des Fragments. So konnten Fragmente mit S Beweglichkeit identifiziert werden, die jedoch Träger von F Antigendeterminanten waren und umgekehrt.

Daß die Unterfraktionen von γ G-Globulin aus elektrophoretisch und chromatographisch verschiedenen S-Fragmenten aufgebaut sind, ist seit längerem bekannt (113,161,88) und konnte von uns bestätigt werden. Die chromatographisch abgetrennten F-Fragmente wurden dagegen als einheitlich in sämtlichen Unterfraktionen beschrieben. Dieser Befund wurde weiter dadurch gestützt, daß das S-Fragment sich immunologisch wie die B-Kette verhält (11,16,14,15) und, wie die chemische Untersuchung erwies, aus einer intakten B-Kette und einem Teil der A-Kette (M = 21 600) zusammengesetzt ist. (24,15,62) Die unterschiedliche Beweglichkeit von B-Ketten aus verschiedenen Unterfraktionen wurde bereits beschrieben. Das F-Fragment dagegen repräsentiert einen großen Teil der A-Kette, die in allen Untersuchungen dieselbe Beweglichkeit besaß.

Trotzdem konnten wir reproduzierbare Fragmente chromatographisch voneinander trennen, die sich in ihrer immunoelktrophoretischen Beweglichkeit voneinander unterscheiden und immunologisch einwandfrei den F-Fragmenten zuzuordnen sind. Da die Rechromatographie diesen Befund bestätigte, handelt es sich um eine echte chromatographische Auftrennung. Dieser Befund wurde sowohl mit CM-Cellulose als auch mit DEAE-Cellulose festgestellt. Auch in der Literatur wurde kürzlich über das Auftreten von 4-5 F-Banden im Stärkegel berichtet. (163, 124) Weiter in dieser Annahme bestärkte uns der Befund, daß im Fall des Paraproteins Zo Peak I zum allergrößten Teil aus F-Fragment zusammengesetzt ist, das sich chromatographisch und elektrophoretisch wie S-Fragment verhält. Erst im zweiten Peak wurde S-Fragment eluiert. Die Beweglichkeit des F-Fragments nimmt nach dem dritten Peak hin zu. Dieser Befund konnte reproduziert werden und scheint für dieses Paraprotein charakteristisch zu sein. Diese Heterogenität des F-Fragments bei einem Paraprotein, das sich ja gerade durch seine Homogenität auszeichnet, war überraschend, umso mehr, da wir erwartungsgemäß nur eine S-Komponente beobachten konnten.

Eine Erklärung für dieses Verhalten könnte in einer geringen Spezifität der enzymatischen Spaltung zu suchen sein. Über die weitläufige Spezifität des Papains wurde bereits berichtet. Auch die Freisetzung von Peptiden könnte dafür sprechen, daß die Spaltung unspezifisch unter zufälliger Abspaltung von Peptiden abläuft. Das ist jedoch nicht sehr wahrscheinlich, da die Freisetzung von Peptiden nicht proportional dem Auftreten von 3,5 S Fragmenten verlief. Nach sechsstündiger Inkubation konnte keine 6,6 S - Komponente mehr festgestellt werden. Die Peptidfraktion nahm jedoch bis zu einem Grenzwert (zwischen 20 und 50 %) weiter zu. Es wurde schon darauf hingewiesen, daß ein Teil der Globuline in leicht denaturiertem Zustand vorliegt oder zu diesem Zustand neigen könnte und damit einer völligen Spaltung durch das Enzym zugänglich ist. Denaturiertes Protein wird durch Papain in Peptide gespalten, ein Vorgang, den man sich zur Herstellung von Peptonen für Bakteriennährböden zunutze macht.

Weiter spricht für die spezifische Spaltung die Tatsache, daß 3,5 S - Fragmente erhalten werden, die in ihren immunologischen und physicochemischen Eigenschaften konstant sind. Putnam et al. ¹⁸⁸ konnte nachweisen, daß verschiedene sulfhydryl-aktivierte Pflanzenproteine (siehe oben) wie Ficin, Bromelain, Chymopain, Papain und deren Mercuriderivate, obwohl sie verschiedene Spezifität besitzen, Human- γ -G-Globulin mit gleicher Aktivität in 3,5 S - Fragmente spalten und in stöchiometrischem Verhältnis neben den N-endsändigen Aminosäuren Asp und Glu zwei neue Aminosäuren freisetzen: Threonin und Leuzin (Isoleuzin). Auch die Tatsache, daß die Spaltung in zwei voneinander unabhängige Schritte aufgelöst werden kann, einer primären proteolytischen und einer sekundären Reduktion von Disulfidbindungen, die zur Spaltung in 3,5 S - Fragmente führt, läßt vermuten, daß das Molekül an einer Stelle angegriffen wird, die besonders exponiert ist. Diese Stelle scheint sehr gering stabilisiert zu sein. γ -G-Globulin hat wie andere Proteine eine so lange Relaxationszeit, daß Fluoreszenzlicht eine teilweise Polarisierung erfährt. Es zeigte sich, daß die Fluoreszenzpolarisation und damit die Relaxationszeit des γ -G-Globulinmoleküls geringer ist, als von einem Molekül von starrer, kompakter Konfiguration der gleichen Größe und Gestalt zu erwarten ist. (Chadwick et al. ²²⁴, Steiner et al. ²²², Noelken et al. ²¹⁶) Eine Erklärung dafür wäre, daß Teile des Moleküls frei rotieren können. (216) Weiter wurde über die leichte Spaltbarkeit von drei Disulfidbindungen berichtet. Wie der Befund von Cebra zeigt, könnte die proteolytische Wirkung des Papains an dem Intrachainring angreifen und eine Peptidbindung sprengen. Eine zweite Reaktion mit einem Mercaptan oder in geringerem Maße auch mit Papain würde dann diese Intrachaindisulfidbindung spalten, sodaß 3,5 S Fragmente entstehen. Daß durch die Aktivierungsmaßnahmen die Interchain Disulfidbindung nicht beeinflusst wird, dürfte an der stärkeren Stabilisierung durch die Tertiärstruktur liegen. Auch die Ähnlichkeit der peptischen Spaltung spricht für einen spezifischen Angriff an einer solchen wenig stabilisierten Stelle.

Das Auftreten verschiedener F - Komponenten ist also wahrscheinlich nicht auf eine zufällige Spaltung, die an verschiedenen Orten des Moleküls angreifen kann, zurückzuführen.

Von Goodman²⁰⁶ wurde beschrieben, daß F durch Pepsin in weitere Untereinheiten gespalten wird, die 3 - 4 Präcipitatinien zeigen, unterschiedliche Wanderungszonen besitzen, jedoch immunologisch mit F nur Teilidentität aufweisen. Unsere F - Fragmente besaßen untereinander immer Vollidentität. Auf die Beziehung zwischen Kohlenhydratgehalt des γ -Globulins und dessen Beweglichkeit wurde bereits hingewiesen, besonders auf die Argumente, die für und gegen eine solche Beziehung sprechen. Fleischman et al.¹⁵ fanden, daß die Kohlenhydrate auf zwei Orten der A - Ketten lokalisiert sind. Ein Glycopeptid ist an den Teil der A - Kette, der dem F - Fragment entspricht, gebunden und ein anderes Glycopeptid an den Teil der A - Kette, der dem S - Fragment zugehört. Durch die Papainwirkung wird dieses Glycopeptid des S - Fragments offensichtlich abgespalten (15). Obwohl diese asymmetrische Verteilung gegen den Befund von Rosevaer (32) spricht, konnte sie doch von Franklin et al.²² bestätigt werden. A = S von mittlerer Beweglichkeit hatte ein molares Verhältnis von Sialinsäure : Fucose = 0,73 - 0,78 und B = F ein Verhältnis von Sialinsäure : Fucose = 0,28 - 0,30. In Fragment C war nur eine ganz geringe Kohlenhydratkomponente zu entdecken. Auch der Gehalt des F - Fragments an Sialinsäure, die ja in einzelnen Unterfraktionen des γ -Globulins schwankt und deren möglicher Einfluß auf die elektrophoretische Beweglichkeit beschrieben wurde, könnte an einem unterschiedlichen Verhalten der chromatographischen und elektrophoretischen Eigenschaften einzelner F - Fragmente verantwortlich sein. Die Tatsache, daß die A - Ketten immer dieselbe Beweglichkeit aufweisen, spricht nicht dagegen, daß sich einzelne F - Fragmente in ihrer Ladung voneinander unterscheiden, selbst wenn man annimmt, daß die Spaltung immer spezifisch an einem Punkt ansetzt.

Daß zwischen der Beweglichkeit der F - Fragmente und der Beweglichkeit der γ -Globulinunterfraktionen ein Zusammenhang besteht, ist unwahrscheinlich. Dies zeigt auch die Beweglichkeit des F - Fragments des Paraproteins Zo, dessen mittlere Wanderungsgeschwindigkeit eher eine schnelle Beweglichkeit des F - Fragments erwarten ließe. Für die Beweglichkeit des γ -Globulinmoleküls ist nach allen Befunden die L - Kette verantwortlich. Der Einfluß des A - Kettenteils auf das chromatographische und vor allem elektrophoretische Verhalten des S - Fragments ist unbekannt.

Auch das F - Fragment des normalen γ -Globulins der Maus, das mit dem Human- γ -Globulin sehr große Ähnlichkeit aufweist, (das immunoelktrophoretische und immunologische Verhalten der S- und F - Fragmente ist identisch mit dem des homologen Human S und F) zeigt verschiedene F - Bande im Stärkegel (Fahey und Asconas 224) und ist auch in seinem chromatographischen Verhalten heterogen.

Wegen dieser Heterogenität der S - und F - Fragmente konnten wir kein exaktes Mengenverhältnis zwischen den F - und S - Fragmenten aufstellen. Aus dem Verhältnis von Peak I zu den restlichen Peaks geht jedoch hervor, daß die S - Komponente mindestens 2/3 des Gesamtmaterials ausmacht. Dieses Mengenverhältnis stimmt auch mit Befunden der Literatur überein.

Die S - und F - Komponenten hatten jedoch mittlere immunoelktrophoretische Beweglichkeit und die S - Komponente von Peak I langsame Beweglichkeit. Auch das abweichende chromatographische Verhalten der Digests von gepooltem γ G-Globulin läßt vermuten, daß geringe Unterschiede zwischen einzelnen Individuen bestehen. Über die Allotypie wurde bereits berichtet.

Der Aufbau eines γ G-Globulinmoleküls aus einem F - Fragment und zwei S - Fragmenten ist auch nach unserem Befund sehr wahrscheinlich. Das intakte Molekül enthält sowohl S - und F - Antigen determinanten. Durch die Papainspaltung gingen keine Determinanten verloren. Manchmal konnte im Ouchterlony eine Doppelung der S - Präzipitationslinie beobachtet werden, die auf das Vornandensein von S - Fragmenten beider Antigentypen zurückzuführen ist. (147,11) Die Präzipitationslinie des F - Fragments war stets scharf. Auffällig ist, daß das F - Fragment selbst bei sehr geringer Konzentration eine scharfe, gut zu identifizierende Präzipitationslinie gegen Anti- γ G ergibt, während bei gleicher Proteinkonzentration das S - Fragment kaum sichtbar präzipitiert. Es scheint, daß für die Antigenität des γ G-Globulins vor allem das F - Fragment verantwortlich ist.

In Abbildung 23 wurde versucht, nach den Ergebnissen der reduktiven Spaltung und der Papainspaltung ein Schema wiederzugeben, das dem heutigen Stand der Kenntnisse m. E. am besten entspricht. Die Antikörperhaftstellen wurden entsprechend dem elektronenoptischen Befund an den gegenüberstehenden Stellen des Ellipsoids gezeichnet, da diese räumliche Anordnung am wahrscheinlichsten erscheint. Die Bedeutung der B - Kette und der A - Kette, die in S lokalisiert ist, für die Spezifität der Antikörperreaktion wird durch die Modulation der B - Kette durch die A - Kette angedeutet. Die spezifische Haftstelle könnte auch auf A (H) liegen und B der modulierenden Komponente entsprechen.

II. γ G - Paraprotein

In einer Vielzahl von Publikationen wurde auf die enge Beziehung zwischen den Immunglobulinen und den in abnormem Maße gebildeten Paraproteinen beschrieben. (11,13,31,42,56,59,108,110,114,115,116,119,120,125) Beobachtete Unterschiede im antigenen Verhalten von MM Proteinen (213) konnten durch die Klassifizierung der Antigentypen I und II erklärt werden. (116,118) Defekte im Paraproteinmolekül beschrieben erstmals Osserman und Franklin beim sog. Heavy Chain-Syndrom.

Qualitative Unterschiede fand Harboe bei Seren, deren normales γ G-Globulin Gm (a+,b-) und deren Paraproteinanteil Gm (A-,b-) war. Auch in unserer Arbeitsgruppe konnten bei einem großen Untersuchungsmaterial Paraproteine beobachtet werden, die in ihrem chromatographischen Verhalten signifikant von dem der normalen γ G-Globulinunterfraktionen verschieden waren. Bei der Fragmentierung und bei der Peptidabtrennung mit der Gel-filtration konnten bei den von uns untersuchten Paraproteinen keine Unterschiede zu den homologen γ G-Globulinen festgestellt werden. Erst das DEAE-Sephadex Chromatogramm zeigte Unterschiede. So konnte im Fall des Paraproteins Ba keine signifikante Trennung der Fragmente erzielt werden. In der Immunoelktrophorese war zwar nur eine einzige Präzipitationslinie zu sehen, im Ouchterlony konnten jedoch eindeutig zwei Präzipitationsli-

nien identifiziert werden, die antigenetisch den S - und F - Fragmenten zugeordnet werden konnten.

Auch im Fall Zo waren die gewonnenen Fragmente antigenetisch identisch mit den Fragmenten des Normalanteils der γ G-Globuline. Eine Teilidentität der Zo pathologischen Fraktionen mit γ G-Globulin auf Grund der beiden Antigentypen konnten wir wegen der geringen Spezifität der verwendeten Antiseren nicht beobachten. Das chromatographische Verhalten der Zo Paraproteinfragmente war jedoch ebenfalls auffällig verändert. In zwei Versuchen wurde an Stelle des S - Fragments ein F - Fragment eluiert. Nach Einsetzen des Gradienten wurde gut abgetrennt ein zweites F - Fragment zusammen mit S eluiert, das im absteigenden Teil des Peak II angereichert war. Dieser Befund war in zweierlei Hinsicht interessant. Erstens wurden trotz der beschriebenen Homogenität der Paraproteine unterschiedliche F - Fragmente gewonnen. Zweitens verhielten sich die S - und F - Komponenten in ihrem chromatographischen Verhalten gerade umgekehrt.

Wegen der Konstanz des ersten Peaks scheint eine zufällige Spaltung unwahrscheinlich. Nimmt man an, daß das Paraprotein eine homogene Fraktion darstellt, so müssen mindestens zwei Stellen der A (H) Kette der enzymatischen Spaltung zugänglich sein. Da diese Spaltung alternativ wäre, ist auch das Vorhandensein von Unterschieden in einer Paraproteinfraktion nicht auszuschließen. Daß auch im Fall Ba zwei unterschiedliche F - Fragmente vorhanden sind, ist nach dem immunoelektrophoretischen Befund sehr wahrscheinlich, obwohl die chromatographische Auftrennung negativ verlief. Aus beiden Fällen kann man ersehen, daß die γ G-Paraproteinfragmente sich in ihrer chromatographischen Verteilung vom konstanten Bild der γ G-Globulinfragmente unterscheiden. Besonders gut ersichtlich ist dies im Fall Zo, wo es möglich war, Bruchstücke des γ G-Globulins mit denen des γ G-Paraproteins vom selben Spender zu vergleichen. Wenn auch in der Immunoelktrophorese die Präzipitationslinien der Digests aller von uns fragmentierten Paraproteine wegen ihrer starken Überschneidung und sichelförmigen Ausbildung vom Bild der normalen γ G-Digests abwichen, so läßt das doch nicht auf sichere Strukturunterschiede schließen. Es ist nicht gesichert, daß Papain immer an derselben Stelle der Sequenz angreift. γ G-Globulin stellt außerdem einen Pool von Globulinen dar. Es ist möglich, daß sich Paraproteine wie bestimmte homogene Unterfraktionen des γ G-Globulins verhalten, die einzeln nicht erfaßt werden können.

Im Fall Porg konnten wir im Gegensatz zu den anderen Fällen bei der Imundiffusion zwischen dem γ G-Paraprotein von α_2 -Beweglichkeit und S - Fragment, aus γ G-Globulin isoliert, keine Kreuzreaktion beobachten. Mit sämtlichen F - Fragmenten von γ G-Globulin, die wir isoliert hatten, besaß es in allen Ansätzen Vollidentität.

Mit nichtdegradiertem γ G-Globulin besitzt dieses Paraprotein ebenfalls nur eine Teilidentität, die wir vor dem Vergleich mit S - und F - Fragmenten als Ausdruck der Zuordnung des Paraproteins zu einem der beiden Antigentypen betrachteten. Da nach Papainspaltung der Sedimentationskoeffizient auf 3,7 S erniedrigt war und Peptide in den bekannten Fraktionen anfielen, durften wir annehmen, daß eine Spaltung des Proteins eingetre-

ten war. In Immunoelktrophorese und Immundiffusion war jedoch kein Unterschied zum nichtdegradierten Paraprotein feststellbar. Auch durch Chromatographie konnten wir keine Auftrennung erzielen. Zudem wurde das degradierte Paraprotein so spät eluiert, wie wir es in keinem anderen Fall beobachten konnten. Die Zuordnung dieses Paraproteins zu den γ G-Globulinen steht wegen der Identität mit F außer Zweifel. Eine Zerstörung des S - Fragments durch Papain scheidet nach dem berichteten Befund aus. Damit bleiben zwei Möglichkeiten: Das Paraprotein Porg. besitzt ein S - Fragment, dessen Antigendeterminantensatz mit unseren Anti- γ G-Antiseren nicht erfaßt werden konnte, oder es handelt sich um einen Defektzustand, wie er erstmals von Osserman und Franklin beschrieben wurde. Obwohl dieser Fall von uns noch nicht weiter abgegrenzt wurde, dürfen wir nach dem oben gesagten annehmen, daß es sich um eine strukturelle Abweichung handelt.

5. ZUSAMMENFASSUNG

1) In vorliegender Arbeit wurde am Beispiel des γ G-Globulins versucht, die Möglichkeiten der Fragmentierung der Immunglobuline und verwandter Paraproteine aufzuzeigen. Von den verschiedenen berichteten Möglichkeiten erwiesen sich zwei Methoden als sehr geeignet: a) die Reduzierung von Disulfidbindungen, b) die enzymatische Spaltung von Peptidbindungen. Die auf Grund der reduktiven Methode gewonnenen Erkenntnisse wurden aus Arbeiten der Weltliteratur zusammengestellt und nach strukturellen Gesichtspunkten geordnet. Befunde aus der Literatur über die enzymatische Spaltung wurden den eigenen Befunden gegenübergestellt.

2) Die von uns angewandte enzymatische Spaltung mit dem Pflanzenzym Papain erwies sich für die den Kliniker interessierenden Fragestellungen als ausreichend empfindlich und wegen der relativ einfachen Technik als sehr gut geeignet. Verschiedene Bedingungen der enzymatischen Spaltung wurden getestet. Die optimalen Bedingungen wurden angegeben. Sie waren für γ G-Globulin und Paraprotein gleich brauchbar. Die Umwandlung in 3,6 S Fragmente war vollständig. 7 S - Komponenten konnten wir nicht mehr feststellen. Die Ergebnisse waren sehr gut reproduzierbar. Ob die Spaltung an einem spezifischen Punkt angreift, wurde nicht bewiesen, ist jedoch sehr wahrscheinlich.

3) Für die Abtrennung der nach der Spaltung anfallenden Peptide erwies sich in unseren Experimenten die Dialyse als wenig brauchbar. Sehr gut geeignet fanden wir die Trennung auf Sephadex G 25 fine. Die Trennung der makromolekularen Komponenten von der Peptidkomponente war vollständig und benötigte nur kurze Zeit. Weiter konnten die Peptide in allen Versuchen in drei Fraktionen aufgetrennt werden. Eine Abhängigkeit der Peptidfreisetzung von der Inkubationszeit mit Papain wurde beobachtet und diskutiert. Ob die Peptide Fragmente darstellen, die bei der Spaltung aus dem Makromolekül herausgebrochen werden oder durch Zertrümmerung von besonders empfindlichen Globulinen entstehen, wurde diskutiert. Letzteres ist wahrscheinlich.

4) In der makromolekularen Fraktion konnten immunoelktrophoretisch eine S- und eine F - Komponente identifiziert werden. Der Antigen-Determinantensatz beider Komponenten war völlig verschieden. Sie zeigten keine Kreuzreaktion. Beide sedimentierten mit $S_{20w} = 3,6$ S. F war antigenetisch stärker wirksam als S.

5. Chromatographische Auftrennung der S - und F - Komponenten konnte mit der in der Literatur angegebenen CM-Cellulose trotz mehrmaliger Rechromatographie nicht erzielt werden. Erst mit dem Anionenaustauscher DEAE-Cellulose konnten S - und F - Fraktionen gewonnen werden. Die einzelnen Fraktionen waren jedoch noch zu heterogen. Sehr gut geeignet zur Fraktionierung war DEAE-Sephadex A 50 Medium. Optimale Bedingungen wurden ausgearbeitet und angegeben. Gut reproduzierbar wurden vier Peaks eluiert. Peak I bestand aus reinem S - Fragment und Peak IV aus reinem F - Fragment. Über die Verteilung von S und F in II und III wurde berichtet. Wegen der Heterogenität von II und III konnten keine zuverlässigen Mengenverhältnisse gemessen werden. Das wahrscheinliche Verhältnis von S : F ist 2 : 1. Die isolierten Fragmente waren immunologisch noch aktiv. Außer S - Fragmenten, die sich in ihrem chromatographischen und elektrophoretischen Verhalten unterscheiden, konnten wir auch bei F - Fragmenten Unterschiede im chromatographischen und elektrophoretischen Verhalten beobachten. Nach unveröffentlichten Befunden Porters sollen auch die A (H) - Ketten aus einem konstanten und einem variablen Teil bestehen. Auch chromatographische Unterschiede zwischen Digests von Einzelseren sowie von Mischseren wurden von uns beobachtet.

6) Spaltungs- und Trennmethoden wurden auf γ G-Paraproteine übertragen. An drei Beispielen wurde das Verhalten der Paraproteine diskutiert. Im Fall Ba und Zo konnten geringe immunoelktrophoretische Unterschiede zu γ G-Globulindigest beobachtet werden. Völlig verschieden zeigte sich das chromatographische Verhalten der Fragmente. Im Fall Zo konnten zwei chromatographisch verschiedene F - Fragmente isoliert werden. F - Fragment aus Peak I wurde unter Bedingungen isoliert, bei denen sonst nur S - Fragment eluiert wurde. Antigenetische Unterschiede konnten bei diesen beiden Fällen nicht entdeckt werden. Das γ G-Paraprotein Porg von α_2 -Beweglichkeit zeigte Vollidentität mit F - Fragment und keine Kreuzreaktion mit S - Fragment. Mit γ G-Globulin besaß es nur Teilidentität, die durch die Zuordnung zu einem Antigentyp bedingt sein konnte. Nach Degradation sank zwar der Sed.koeff. auf 3,7 S, immunoelktrophoretisch und immunologisch wurde jedoch keine Veränderung beobachtet. Ob dieses Paraprotein ein S - Fragment besitzt, dessen Antigendeterminanten von denen des normalen S völlig verschieden sind, oder ob das S - Fragment ganz fehlt, wurde nicht abgeklärt. Ein struktureller Unterschied ist jedoch sehr wahrscheinlich. Mit diesen Beispielen wird darauf hingewiesen, daß auch für den Kliniker mit dieser Methode bessere diagnostische Erkenntnisse gewonnen werden können, wie es z. B. im Fall des Heavy Chain Syndroms bereits geschah.

E. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. R.A. Phelps, K.E. Neet, L.T. Lynn and F.W. Putnam
The Cupric Ion Catalysis of the Cleavage of γ -Globulin and
Other Proteins by Hydrogen Peroxyde
J.Biol.Chem. 236 (1961) 96
2. A. Patchornik, W.B. Lawson and B. Witkop
Selective Cleavage of Peptide Bonds, II The Tryptophyl Peptide
Bond and the Cleavage of Glucagon J.Am.Chem.Soc. 80 (1958) 4747
3. G.L.Schmir, L.A. Cohen and B. Witkop
The Oxydative Cleavage of Tyrosyl-Peptide Bonds I. Cleavage
of Dipeptides and Some Properties of the Resulting Spiro-
dienonolactones J.Am.Chem.Soc. 81 (1959) 2228
4. M.L. Peterman
The Spliting of human Gamma Globulin Antibodies by Papain and
Bromelin J.Am.Chem.Soc. 68 (1946) 106
5. G.M. Edelman
Dissoziation of γ -Globulin J.Am.Chem.Soc. 81 (1959) 3155
6. F. Franek
Dissoziation of Animal γ -Globulins By Cleavage of Disulfide
Bonds. Biochem. Biophys. Res. Commun. 4 (1961) 28
7. A. Ramel, E. Stellwagen, H.K. Schachman
Subunits of Protein Fed.Proc. 20 (1961) 300 - 305
Proteins Polypeptides
8. G.M. Edelman and M.D. Poulik
Characterization of Subunits of the γ -Globulins
Fed.Proc. 20 (1961) 387 Immunology
9. J.B. Fleischman, R.H. Pain and R.R. Porter
Reduction of γ -Globulin Arch.Biochem.Biophys.Suppl. 1,(1962) 174
10. G.M. Edelman and M.D. Poulik
Studies on Structural Units of the γ -Globulin
J.Expul.Med. 113 (1961) 861
11. D.E. Olins and G.M. Edelman
The Antigenic Structure of the Polypeptide Chains of Human
 γ - Globulin J.Exp.Med. 116 (1962) 635
12. G.M. Edelman and B. Benacerraf
On Structural and Functional Relations Between Antibodies and
Proteins of the Gamma-System Proc. Natl. Acad. Sci. 48
1 - 6 (1962) 1035
13. G.M. Edelman, M.D., and J.A. Gally
The Nature of Bence Jones Proteins
Chemical Similarities to Polypeptide Chains of Myeloma Globu-
lins and Normal γ -Globulins J.Exp.Med. 116, 1-3 (1962) 207

14. J.B. Fleischman, R.H. Pain, and R.R. Porter
Reduction of γ -Globulin Arch.Biochem.Biophys.Suppl.1 (1962) 174
15. J.B. Fleischman, R.R. Porter, and E.M. Press
The Arrangement of the Peptide Chains in γ -Globulin
Biochem.J. 88 (1963) 220
16. S. Cohen
Properties of the Peptide Chains of Normal and Pathological
Human γ -Globulin Biochem.J. 89 (1963) 334
17. R.R. Porter
Basic Problems in Neoplastic Disease 1962 Columbia University
Press. The Structure of Gamma-Globulin and Antibodies
18. P.A. Small, J.E. Kehn, M.E. Lamm
Polypeptide Chains of Rabbit Gamma Globulin Science 142 (1963)
393
19. H. Metzger and S.J. Singer
Binding Capacity of Reductively Fragmented Antibodies to the
2,4-Dinitrophenyl Group Science 142 (1963) 674
20. R.R. Porter
Structure of Antibodies
Protides of the Biological Fluids Vol. 11 (1963)
21. G.M. Edelman, D.E. Olins, J.A. Gally, N.D. Zinder
Reconstruction of Immunologic Activity By Interaction of Poly-
peptide Chains of Antibodies. Proc.Natl.Acad.Sci. 50 (1963) 753
22. G.M. Edelman, B. Benaceraff, Z. Ovary and M.D. Poulik
Structural Differences Among Antibodies of Different Specificities
Proc.Natl. Acad. Sci. 47 (1961) 1751
23. G.M. Edelman and M.D. Poulik
Characterization of Subunits of the γ -Globulins
24. R.H. Pain
The Molecular Weights of the Peptide Chains of γ -Globulin.
Biochem.J. 88 (1963) 234
25. W.W. Kielley and W.F. Harrington
A Model For The Myosin Molecule Biochem.Biophys.Acta 41
(1960) 406
26. R. Trautman and C.F. Crampton
Application of the Archibald principle for the ultracentrifugal
determination of the molecular weight in urea solutions of hi-
stone. Fractions from calf thymus J.Am.Chem.Soc. 81 (1959) 4036
27. O.O. Blumenfeld and P.M. Gallop
The Participation of Aspartyl Residues in the Hydroxylamine -
Sensitive Bonds of Collagen Biochem. 1 (1962) 947

28. O. Smithies
Zone Electrophoresis in Starch Gel: Group Variations in the Serum Proteins of normal Human Adults Biochem.J. 61, (1955) 629
29. O. Smithies
An Improved Procedure for Starch Gel Electrophoresis: Further Variations in the Serum Proteins of Normal Individuals Biochem. J. 71 (1959) 585
30. M.D. Poulik
The Use of Urea-Starch-Gel Electrophoresis in Studies of Reductive Cleavage of an α_2 Macroglobulin Biochem.Biophys.Acta 44 (1960) 390
31. M.D. Poulik and G.M. Edelman
Comparison of Reduced Alkylated Derivatives of Some Myeloma Globulins and Bence Jones Proteins Nature 191 (1961) 1274
32. W. Putnam
Formation, Structure and Functions of the Gamma Globulins VI. Internationaler Kongress für klinische Chemie 1966 München
33. G.M. Edelman, B. Benacarra, Z. Ovary
Structure and Specificity of Guinea Pig γ S Antibodies J. Exp.Med. 118 (1964) 229
34. E.L. Smith, R.D. Greene, and E. Bartner
Aminoacid and Carbohydrat Analysis of Some Immune Proteins J.Biol.Chem. 164 (1946) 359
35. Seibert F.B., Pfaff M.L. und M.V. Seibert
Arch.Biochem. 18 (1948) 279 zit. n. M. Knedel
36. H.E. Weimer, J. Redlich-Moshin, D. Salkin, and R.A. Boak
Distributions of Glycoproteins in Normal Human Plasma Proc.Soc.Exptl.Biol.Med. 87 (1954) 102
37. H.J. Müller-Eberhard, H.G. Kunkel, E.C. Franklin
Two Types of γ -Globulin Differing in Carbohydrat Content Proc.Soc.Exp.Biol.Med 93 (1956) 146
38. H.E. Schultze und H. Biehl
Behringwerk-Mitt. 30 (1955) 72
39. J. Sonnet
Les Glycoproteines sériques à l'état normal et pathologique Ed.Arscia, Bruxelles 1956 zit. n. M. Knedel 68
40. M. Knedel
Habilitationsschrift: Zur Biochemie und Immunologie der γ -Globuline. 1960
41. K. Heide, H. Haupt, R. Schmidtberger
Über den Kohlenhydratgehalt von Proteinen des menschlichen γ -Globulinkomponentensystems. Behringwerke Mitt. 37 (1959) 29

42. H.J. Müller-Eberhard and H.G. Kunkel
The Carbohydrate of γ -Globulin and Myeloma Proteins
J.exp.Med. 104 (1956) 253
43. P. Böhm und L. Baumeister
Über Vorkommen und Bestimmung von Neuraminsäure im Fibrin
Klin. Wschr. 33 (1955) 712
44. P. Böhm, St. Dauber, L. Baumeister
Über Neuraminsäure, ihr Vorkommen und ihre Bestimmung im Serum
Klin. Wschr. 32 (1954) 289
45. Z. Dische and L.B. Shettles
A Specific Color Reaktion of Methylpentoses and a Spectrophotometric Micromethod for their Determination J.Biol.Chem. 175 (1948) 595
46. J.R. Cann, R.A. Brown, J.G. Kirkwood, J.H. Hink
Fraktionation of Human Immun γ -Globulin J.Biol.Chem. 185 (1950) 667
47. J.R. Cann, R.A. Brown, J.G. Kirkwood
Application of Electrophoresis. Convection to the Fraktionation of Bovine γ -Globulin J.Biol.Chem. 181 (1949) 161
48. J.L. Oncley, M. Melin, D.A. Richert, J.W. Cameron, P.M. Gross
The Separation of the Antibodies, Isoagglutinins, Prothrombin, Plasminogen, and γ -Lipoprotein into Subfraktions of Human Plasma
J.Am.Chem.Soc. 71¹ (1949) 543
49. B. Jager, E.L. Smith, M. Nicherson, and D.M. Douglas
Immunological and Electrophoretic Studies on Human γ -Globulins
J.Biol.Chem. 176 (1948) 1177
50. Frank.W. Putnam
The Heterogenity of Serum Globulins J.Cell. and Physiol. v 47 supplement 1, May Pages 17 - 20 (1956)
51. H. Isliker
Zur Chemie der Makroglobuline. Makroglobulinämie Waldenström
G.Riva Verlag: B. Schwabe & Co 1958
52. J.W. Rosevear, E.L. Smith
Structure of Glycopeptides from a Human γ -Globulin
J.Am.Chem.Soc. 80 (1958) 250
53. R.R. Porter
A Chemical Study of Rabbit Antiovalbumin Biochem.J. 46 (1950) 473
54. S. Fleischer, R.L.Hardin, J. Horowitz, M. Zimmerman, E. Gresham, J.E.Turner, J. P. Burnett, Z. Stary, F. Haurowitz
Composition of Antibodies against Acidic and Basic Azoproteins
Arch.Biochem.Biophys. 92 (1961) 329

55. M.L. McFadden and E. Smith
Free Amino Groups and N-terminal Sequence of Rabbit Antibodies
J.Biol.Chem. 185 (1955) 214
56. F. W. Putnam
N-terminal Groups of Normal Human γ -Globulin and Of Myelom Proteins
J. Am.Chem.Soc. 75 (1953) 2785
57. M.L. McFadden and E.L. Smith
The Free Amino Groups of Different Spezies J.Am.Chem.Soc. 75 (1953) 2784
58. S. Eriksson and J. Sjöquist
Quantitativ Determination of N-terminal Amino Acids in Some Serum Proteins Biochem.Biophys.Acta 45 (1960) 290
59. F. W. Punam
Abnormal Human Serum Globulins II Physical Constants and Amino End Groups J.Biol.Chem. 233 (1958) 1448
60. R. Heimer, K.R. Woods, R.L. Engle
Amino Acid-Analysis of Rheimatoid Factors and Normal Gammaglobulins Proc.Soc.exp.Biol. N.Y. 110 (1963) 496
61. Shu-Hsi Hsiao and F.W. Putnam
The Cleavage of Human γ -Globulin by Papain
J.Biol.Chem. 236 (1961) 122
62. M.J. Crumpton and J.M. Wilkinson
Amino Acid Composition of Human and Rabbit γ - Globulin and of the Fragments Produced by Reduction Biochem.J. 88 (1963) 228
63. E.L. Smith, M.L.McFadden, A. Stickell, V. Buettner-Janusch
Amino Acid Composition of Four Rabbit Antibodys
J.Biol.Chem. 214 (1955) 197
64. E. Waldenschmidt-Leitz, G. Bretzel und L. Keller
Nachweis von Oxylysin in Serumproteinen
Naturwissenschaften 11, (1960) 254
65. P.B. Hamilton and R.A. Anderson
Hydroxylysine in Proteins J.Am.Chem.Soc. 77 (1955) 2892
66. M.E. Koshland and F.M. Englberger
Differences in the Amino Acid Composition of Two Purified Antibodys From the Same Rabbit
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S. 50 (1963) 61
67. M.E. Koshland, F.M.Englberger and R. Shapanka
Differences in the Amino Acid Composition of a Third Rabbit Antibody Science 143 (1964) 1130
68. A. L. Grossberg and D. Pressman
Nature of the Combining Site of Antibody against a Hapten Bearing a Positiv Charge J.Am.Chem. 82 (1960) 5478

69. B. Jirgensons

Optical Rotation and Viscosity of Native and Denatured Proteins
X. Further Studies on Optical Rotatory Dispersion
Arch.Biochem.Diophys. 74 (1958) 57

70. M. Winkler and D. Doty

Some Observations on the Configuration and Precipitating
Activity of Antibodies Biochem.Biophys.Acta 54 (1961) 448

71. J.L. Palmer and A. Nisonoff

Dissociation of γ -Globulin into Half-Molecules after Reduction
of One Labile Disulfide Bond Biochemistry 3,(1964) 863

72. J.L. Palmer, A. Nisonoff, and K.E. Van Holde

Dissoziation of Rabbit Gamma Globulin into Subunits by Reduction
and Acidification. Proc.Nat.Acad.Sc. 50 (1963) 314

73. P. Alexander and L.D.G. Hamilton

Changes in the Reaktivty of Disulfide Bonds in Bovine Serum
Albumin on Denaturation Arch.Biochem.Biophys. 88 (1960) 128

74. G. Markus and F. Karush

The Disulfide Bonds of Human Serum Albumin and Bovine γ -Globulin
J.Am.Chem.Soc. 79 (1957) 134

75. D. Katchalski, G.S. Benjamin and V. Gross

The Availability of the Disulfide Bonds of Human and Bovine
Serum, Albumin and of Bovine γ -Globulin to Reduction by
Thioglycolic Acid J.Am.Chem.Soc. 79 (1957) 4096

76. R. Cecil and R.G. Wake

The Reaktionen of Inter and Intrachain Disulfide Bonds in Protein
with Sulfit. Biochem.J. 82 (1962) 401

77. G. Markus, A.L. Grossberg and D. Pressman

The Disulfide Bonds of Rabbit γ -Globulin and its Fragments
Arch.Biochem.Biophys. 96 (1962) 63

78. R.E. Benesch and R. Benesch

Amperometric Determination of Soluble Mercapto Groups
(Glutathion) in Blood and Tossue Arch.Biochem. 28 (1950) 43

79. R.E. Benesch, H.A. Lardy, R. Benesch

The Sulfhydryl Groups of Christallin Proteins I Some Albumins,
Encyms and Hemoglobins J.Biol.Chem. 216 (1955) 663

80. C.R. MacDonnell, R.B. Silva, and R.E. Feeney

Sulfhydryl Groups of Ovalbumin Arch.Biochem.Biophys. 32
(1951) 288

81. A. Nisonoff, F.C. Wissler, L.N. Lipman, and D.L. Woernley

Separation of Univalent Fragments from the Bivalent Rabbit
Antibody Molekule by Reduction of Disulfide Bonds.
Arch.Biochem.Biophys. 89 (1960) 230

82. A. Nisonoff, F.C. Wissler, L.N. Lipman
Properties of the Major Component of a Peptic Digest of Rabbit
Antibody Science 132 (1960) 1770
83. W.J. Mandy M.M. Rivers, and A. Nisonoff
Recombination of Univalent Subunits Derived from Rabbit Anti-
body J.Biol.Chem. 236 (1961) 3221
84. A. Nisonoff, G. Markus, F.C. Wissler
Separation of Univalent Fragments of Rabbit Antibody by Reduc-
tion of a Single, Labile Disulfide Bond Nature 189 (1961) 293
85. W.J. Mandy and A. Nisonoff
Effekt of Reduction of Several Disulfide Bonds on the Proper-
ties and Recombination of Univalent Fragments of Rabbit Anti-
body. J.Biol.Chem. 238 (1963) 206
86. W.J. Mandy and A. Nisonoff
Studies on the Recombination of Univalent Fragments of Rabbit
Antibody. Fed.Proc. 21 (1962) 23
87. J.L. Palmer and A. Nisonoff
Reduction and Reoxydation of a Critical Disulfide Bond in the
Rabbit Antibody Molecule J.Biol.Chem 238 (1963) 2393
88. J.L. Palmer, W.J. Mandy and A. Nisonoff
Proc.Natl. Acad.Sci. 49 (1962) 49
Heterogeneity of Rabbit Antibody and its Subunits
89. A. Nisonoff and J.L. Palmer
Hybridization of Half Molecules of Rabbit Gamma Globulin
Science 143 (1964) 355
90. A. Nisonoff and W.J. Mandy
Quantitativ Estimation of the Hybridization of Rabbit Antibodies
Nature 194 (1962) 355
91. A. Nisonoff and M.M. Rivers
Recombination of a Mixture of Univalent Antibody Fragments of
Different Spezifity Arch.Biochem. 92,93 (1961) 460
92. D.E. Olins and F.M. Edelman
Reconstitution of 7S Molecules From L and H Polypeptide Chains
of Antibodies and γ -Globulins.
93. H.H. Fudenberg, G. Drews, and A. Nisonoff
Serologic Demonstration of Dual Spezifity of Rabbit Bivalent
Hybrid Antibodies J.Exp.Med. 119 (1964) 151
94. W.H. Hitzig
Immunbiologische Reaktionen des cellulären und des humoralen
Systems Schweiz.Med.Wschr. 93 Jr. (1963) Nr. 41 1433
95. H.E. Schultze
Immunitätslehre Klin.Gegenw. IX, (1960) 423

96. F. Schmid
Antigene Determinanten Fortschr.Med. 82.Jg. (1964) Nr. 18 684
97. E.A. Kabat
Some Configurational Requirements and Dimensions of the Combining Site on an Antibody to a Naturally Occuring Antigen
J.Am.Chem.Soc. 76 (1954) 3709
98. H.P. Treffers
Some Contributions of Immunology to the Study of Proteins
Adv. in Prot. Chem. Vol. I (1944) 69
99. B.V. Jager, E.L. Smith, M. Nickerson and D.M. Brown
Immunological and electrophoretic Studies on Human γ -Globulin
J.Biol.Chem. 176 (1948) 1177
100. M. Cohn, H.F. Deutsch and L.R. Wetter
J. Immunol. 64 (1950) 381 zit. nach Isliker (102)
101. S. Dray and G.O. Young
Two Antigenetically different γ -Globulins in Domestic Rabbits Revealed by Isoprecipitins Science 129 (1959) 1023
102. S. Dubiski, D. Skalba, A. Dubiski, A. Kelus
Iso-antigens of Rabbit γ -Globulin. Nature 184 (1959) 1811
103. R. Grubb and A.B. Laurell
Hereditary Serological Human Serum Groups
Acta.Path.Microb.Scand. 39 (1956) 390
104. R. Grubb
Agglutination of Erythrocytes Coated with Incomplete Anti-Rh by Certain Rheumatoid Arthritic Sera and Some Other Sera. The Existence of Human Serum Groups
Acta.Path.Microb.Scand. 39 (1956) 195
105. M. Harboe and J. Lundevall
A New Typ in The Gm System Acta Path.Microb.Scand. 45 (1959) 357
106. C. Roparth, J. Lenoir and L. Rivat
A New Inheritable Property of Human Sera: The InV Factor
Nature 189 (1961) 586
107. A.G. Steinberg, J. Wilson and S. Lanset
A New Human Gamma Globulin Factor Determined by an Allele at the InV Locus Vox Sang. 7 (1962) 151
108. J.L. Fahey and S.D. Lawler
Gm Factors in Normal γ -Globulin Fractions, Myelom Proteins, and Macroglobulins J.Natl.Canc.Inst. 4-6 27 (1961) 973
109. E.C. Franklin, H. Fudenberg, M. Meltzer, D.R. Stanworth
The Structural Basis For Genetic Variations of Normal Human γ - Globulins Proc.Natl.Acad.Sci. 48 1 - 6 (1962) 614

110. H. Fudenberg and E.C. Franklin
Human Gamma Globulin Genetic Control and Its Relation to Disease
Annals Int.Med. 58 Nr. 1 (1963) 171
111. S.H. Polmar and A.G. Steinberg
Dependence of a Gm (b) Antigen on the Quaternary Structure of
Human Gamma Globulin Science 145 (1964) 928
112. P. Speiser
Über Antikörperbildung von Säuglingen und Kleinkindern gegen
mütterliches γ_2 -Globulin. Ein bisher unbekanntes, dem Erythro-
blastosemechanismus konträres Phänomen mit anscheinend immuno-
genetisch obligatem Charakter. Wiener Med.Wschr. 113
Nr. 51/52 (1963) 966
113. G.M. Edelman, J.F. Heremans, M.Th. Heremans, H.G. Kunkel
Immunological Studies of Human γ -Globulin
Relations of the Precipitin Lines of Whole γ -Globulin to Those
of the Fragments Produced by Papain. J.Exp.Med. 112,(1960) 203
114. L. Korngold and R. Lipari
Multiple-Myelom Proteins. I. Immunological Studies
Cancer 9 (1956) 183
115. L. Korngold and R. Lipari
Multiple-Myelom Proteins III. The Antigenic Relationship of
Bence Jones Proteins to Normal Gamma Globulin and Multiple-
Myelom Serum Proteins Cancer 9 (1956) 262
116. M. Mannik and H.G. Kunkel
Classification of Myelom Proteins, Bence Jones Proteins, And
Macroglobulins into Two Groups on the Basis of Common Anti-
genic Characters J. Exp.Med. 116 (1962) 859
117. S. Stein, R.L. Nachman and R.L. Engle
Individual and Sub.Group Antigenic Specificity of Bence Jones
Protein Nature 200 (1963) 1180
118. M. Mannik and H.G. Kunkel
Two Major Types of Normal γ S γ -Globulin
J.Exp.Med. 117 (1962) 213
119. J.L. Fahey
Two Types of 6,6 S γ -Globulin, γ_2 A-Globulin and 18 S γ_1 -Macro-
globulins in Normal Serum and γ -Microglobulins in Normal Urin
I. Immunolog. 91 (1963) 438
120. J. L. Fahey
Structural Basis for the Differences Between Type I and Type II
Human γ -Globulin Molecules J.Immunol. 91 (1964) 448
121. S. Dray
Three γ -Globulins in Normal Human Serum Revealed by Monkey
Precipitins Science 132 (1960) 1313

122. P. Burtin

A Third Antigenic Type of Human γ -Globulin Nature 202 (1964) 1019

123. J.F. Heremans, M.T. Hermens and H.E. Schultze

Isolation and Description of a Few Properties of the γ 2A Globulin of Human Serum Clin.Chem.Acta 4 (1959) 96

124. E.C. Franklin and H.G. Kunkel

Immunologic Differences Between the 19S and 7S Components of Normal Human Serum γ -Globulins J.Immunol. 78 (1957) 11

125. H.F. Deutsch, C.H. Kratochvil, A.E. Reif

Immunochemical Relation of Bence Jones Proteins to Normal Serum Proteins J.Biol.Chem. 216 (1955) 103

126. E.C. Franklin

Observations on the Structure of Human 7S γ -Globulin: Studies Using Antisera to Bence Jones Proteins J.Immunol. 91 (1963) 730

127. J. H. Schwartz and G.M. Edelman

Comparisons of Bence-Jones Proteins and L-Polypeptide Chains of Myeloma Globulins After Hydrolysis with Trypsin. J.Exp.Med. 118 (1963) 41

128. W. V. Epstein, M. Tan, D. Gross

Blocked Antigenic Sites on the L-Chain of Human Gamma-Globulin Nature 202 (1964) 1175

129. M. Metzger and S.J. Singer

Binding Capacity of Reductively Fragmented Antibodies to the 2,4-Dinitrophenyl Group Science 142 (1964) 674

130. R.L. Nachman and R.L. Engle

Gamma Globulin: Unmasking of Hidden Antigenic Sites on Light Chains Science 145 (1964) 167

131. E.C. Franklin M.D., J. Loewenstein, B. Bigelow, M. Meltzer

Heavy Chain Disease. A New Disorder of Serum γ Globulin. Report of The First Case. A.J. of Med. 37, 3 (1964) 332 - 350

132. E.F. Osserman, K. Takatsuki

Clinical And Immunochemical Studies of Four Cases of Heavy Chain (H) ₂ Disease A. J. of Med. 37, 3 (1964) 351 - 373

133. R.E. Ballieux, G.M. Bernier, K. Tominaga and F.W. Putnam

Gamma Globulin Antigenic Types Defined by Heavy Chain Determinants Science 145 (1964) 168

134. N.K. Jerne

The Natural-Selection Theory of Antibody Formation Proc.Natl.Acad.Sci. 41 (1955) 849

135. J. Lederberg

Genes and Antibodies Science 129 (1959) 1649

136. L. Pauling
A Theory of the Structure and Process of Formation
of Antibodies J.Am.Chem.Soc. 62 (1940) 2643
137. L. Pauling, D. Pressman, D.H. Campbell
The Serological Properties of Simple Substances VI. The Precipitation of a Mixture of two Specific Antisera by a Dihaptenic Containing the Two Corresponding Haptenic Groups, Evidence for the Framework Theory of Serological Precipitation.
J.Am.Chem.Soc. 66 (1944) 330
138. H.N. Eisen and F. Karush
The Interaction of Purified Antibody with Homologous Hapten. Antibody Valence and Binding Constant
J.Am.Chem.Soc 71 (1949) 263
139. M.E. Carsten and H.N. Eisen
The Specific Interaction of Some Dinitrobenzenes with Rabbit Antibody to Dinitrophenyl-Bovine γ -Globulin
J.Am.Chem.Soc. 77 (1955) 1273
140. J.S. Singer and D.H. Campbell
Chemical Studies of Soluble Antigen-Antibody Complexes I. The Valence of Precipitating Rabbit Antibody
J.Am.Chem.Soc. 74 (1952) 1794
141. O. J. Plescia, E.L. Becker, J.W. Williams
The Valence of Precipitating Antibodies J.Am.Chem.Soc. 74 (1952) 1794
142. H.E. Müller und F. Gramlich
Zur Valenz von Antigenen und Antikörpern aus rein dargestellten Antigen-Antikörper-Präzipitaten Zschr.Immun.Allgerg. 127 (1964) 156
143. O.A. Roholt, G. Radzimski, and D. Pressman
Antibody Combining Site: The B Polypeptide Chain
Science 141 (1963) 726
144. S.J. Singer
On the Chemical Structure of The Reactive Sites of Antibody Molecules Proc.Natl.Acad.Sci. 41 (1955) 1041
145. G.M. Edelman and E.A. Kabat
Studies on Human Antibodies I. Starch Gel Electrophoresis of the Dissoziated Polypeptid Chain J.Exp.Med. 119 (1964) 443
146. C. E. Buckley, P.L. Whitney, and C. Tanford
The Unfolgding and Renaturation of a Spezific Univalent Antibody Fragment Proc.Natl.Acad.Sci. 50 (1963) 827
147. M. Mannik and H.G. Kunkel
Localisation of Antibodies in Group I and Group II γ - Globulin J.Exp.Med. 118 (1963) 817
148. N.C. Hughes-Jones
The Nature of the Reaction Between Antigen and Antibody Brit.Med.Bull. 19 (1963) 171

149. M.L. Peterman
The Splitting of Human Gamma Globulin Antibodies by Papain and Bromelin J.Am.Chem.Soc. 68 (1946) 106
150. R.R. Porter
The Formation of a Specific Inhibitor by Hydrolysis of Rabbit Antiovalbumin Biochem.J. 46 (1950) 479
151. R.R. Porter
Seperation and Isolation of Fragments of Rabbit Gamma-Globulin containing the Antibody and Antigenic Combining Sites Nature 182 (1958) 670
152. R.R. Porter
The Hydrolysis of Rabbit γ -Globulin and Antibodies with Crystalline Papain Biochem.J. 73 (1959) 119
153. F. Karush
Properties of Papain-Digested Purified Antihapten Antibody Fed.Proc. 18 (1959) 577
154. A. Nisonoff and D.L. Woernley
Effects of Hydrolysis by Papain on the Combining Sites of an Antibody Nature 183 (1959) 1325
155. P.A. Charlwood
Ultracentrifugal Examination of Digestion Products from Rabbit γ - Globulin Biochem.J. 73 (1959) 126
156. F. W. Putnam, M. Tan, L.T. Lynn, C.W. Easley and S. Migita
The Cleavage of Rabbit γ -Globulin by Papain J.Biol.Chem. 237 (1962) 717
157. F.W. Putnam, S. Hsiao and M. Tan
Papain Cleavage of Human and Rabbit γ -Globulin Fed.Proc. 19 (1960) 77
158. H.W* Goodman
Reaction of Theumatoid Sera with Fragments of Papain-Digested Rabbit Gamma Globulin Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 106 (1961) 822
159. E.C. Franklin
Some Properties of the Breakdown Products of Human γ S Gamma Globulin and Antibodies J.Clin.Inv. 39 (1960) 986
160. E.C. Franklin and F. Prelli
Structural Units of Human γ S Gamma Globulin J.Clin.Inv. 39 (1960) 1933
161. D. Stolinsky and H. Fudenberg
On the Univalent Fragments of Human γ S Gamma-Globulin Nature 200 (1963) 856
162. H.F. Deutsch, E.R. Stiehm and J. Morton
Action of Papain on Human Serum Globulins J.Biol.Chem. 236 (1961) 2216

163. S. Migita and F.W. Putnam
Antigenic Relationships of Bence Jones Proteins, Myeloma Globulins and Normal Human γ -Globulin J.Exp.Med. 117 (1963) 81
164. E.C. Franklin and D.R. Stanworth
Antigenic Relationship Between Immune Globulins and Certain Related Paraproteins in Man J.Exp.Med. 114 (1961) 521
165. Z. Ovary and F. Karush
Studies on the Immunologic Mechanism of Anaphylaxis
J.Immunol. 86 (1961) 146
166. M. Harboe, C.K. Osterland and H. G. Kunkel
Localization of Two Genetic Factors to Different Areas of γ -Globulin Molecules Science 136 (1962) 979
167. E. A. Peterson and H. A. Sober
Chromatography of Proteins. I Cellulose Jio-exchange Adsorbents
J.Am.Chem.Soc. 78 (1956) 751
168. H.A. Sober, F.J. Gutter, M.M. Wyckoff and E.A. Peterson
Chromatography of Proteins II. Fraktionation of Serum Protein on Anion-exchange Cellulose J.Am.Chem.Soc. 78 (1956) 756
169. H.A. Sober and E.A. Peterson
Protein Chromatography on Ion Exchange Cellulose
Fed.Proc. 17 (1958) 1116
170. E. A. Peterson, M.M. Wyckoff and H.A. Sober
Gradient Chromatography of Human Serum Proteins and its Application to the Examination of Albumin and Globulin Obtained by Ammonium Sulfate Fractionation Arch.Biochem.Biophys. 93 (1961) 428
171. K.B. Cooke, M.P. Tombs, R.D. Weston, F. Souter and N.F. MacLagan.
The Chromatography of Serum Proteins on Cellulose Ion Exchange. Columns Clinica Chemica Acta 4 (1959) 779
172. M.P. Tombs, K.B. Cooke, D. Burston and N.F. MacLagan
The Chromatography of Normal Serum Proteins Biochem.J. 80 (1961) 284
173. J.L. Fahey and A.P. Horbett
Human Gamma Globulin Fractionation on Anion Exchange Cellulose Columns J.Biol.Chem. 234 (1959) 2645
174. J.L.Fahey, P.F. McCoy and M. Gouglian
Chromatography of Serum Poteins in Normal and Pathologic Sera
J.Clin.Inv. 37 (1958) 272
175. J.L. Fahey
Chromatographic Studies of Anomalous γ -, γ 2A and Macroglobulins and Normal γ -Globulins in Myeloma and Macroglobulinemic Sera
J.Biol.Chem. 237 (1962) 440

176. Fateh und M. Knedel in Vorbereitung
177. P. Grabar and C.A. Williams
Méthode Permettant Conjuguée Des Propriétés Electrophorétiques
Et Immunochimiques D'un Mélange De Protéines Application Du
Sérum Sanguin Biochim.Biophys.Acta 10 (1953) 193
178. C.A. Williams and P. Grabar
Immunoelectrophoretic Studies in Serum Proteins
I. The Antigens of Human Serum J.Immunol. 74 (1955) 158
II. Immune Sera: Antibody Distribution J. Immunol. 74 (1955) 397
III. Human Gamma Globulin J.Immunol. 74 (1955) 404
179. J.J. Scheidegger
Une Micro-méthode de L'immuno-electrophorese Int.Arch.Allergy
1 (1955) 103
180. A.J. Crowle
Immunodiffusion Academic Press N.Y. 1961
181. M.P. Tombs, F. Souter and N.F. MacLagan
The Spectrophotometric Determination of Protein at 210 mμ
J.Biol.Chem. 73 (1959) 167
182. H. Wu
A New Colorimetric Method For the Determination of Plasma
Proteins J.Biol.Chem. 51 (1922) 33
183. O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A. Farr, R.J. Randall
Protein Measurement with Folin Phenol Regent J.Biol.Chem. 193
(1951) 265
184. H.O. Calvery
Crystalline Egg Albumin J.Biol.Chem. 102 (1933) 73
185. A. Walti.
Crystalline Ficin J.Am.Chem.Soc. 60 (1938) 493
186. M. Bergman, J.S. Fruton and H. Fraenkel-Conrat
On Proteolytic Enzymes XV. Regarding the General Nature of
Intracellular Proteolytic Enzymes J.Biol.Chem. 119 (1937) 35
187. B.C. Carpenter and F.E. Lovelace
The isoelectric Point of Asclepain J.Am.Chem.Soc. 65
(1943) 2364
188. F.W. Putnam, E.W. Easley, L.T. Lynn
Site of Cleavage of γ -Globulins by Papain Biochem.Biophys.
Acta 58 (1962) 279
189. Wurtz
Comt.rend. de l'acad. des Sci. xci, p. 788 (1880) zit.n.Mendel
190. L.B. Meldel and A.F. Blood
Some Peculiarities of the Proteolytic Activity of Papain
J.Biol.Chem. 8 (1911) 177

191. R. Willstätter und W. Grassmann
Über die Aktivierung des Papains durch Blausäure
Z.phys.Chem. (Hoppe-Seyler) 138 (1924) 184
192. M. Bergmann, L. Zervas and J.S. Fruton
On Proteolytic Enzymes VI. On the Specificity of Papain
J.Biol.Chem. 111 (1935) 225
193. M. Bergmann, L. Zervas and W.F. Ross
On Proteolytic Enzymes VII. The Synthesis of Peptides of
1-Lysin and their Behaviour with Papain H J.Biol.Chem. 111
(1935) 245
194. M. Bergmann and W.F. Ross
On Proteolytic Enzymes VIII. The Proteolytic Systems of Papain
J.Biol.Chem. 111 (1935) 659
195. A.K. Balls, Hans Lineweaver and R.R. Thompson
Crystalline Papain Science 86 (1937) 379
196. J.R. Kimmel and E.L. Smith
Crystalline Papain I Preparation, Specificity, and Activation
J.Biol.Chem. 207 (1964) 515
197. E.L. Smith, J.R. Kimmel and D.M. Brown
Crystalline Papain II. Physical Studies; The Mercury Complex
J.Biol.Chem. 207 (1954) 533
198. E. O. P. Thompson
Crystalline Papain: IV Free Amino Groups and N-Terminal Sequence
J.Biol.Chem. 207 (1954) 563
199. T. Bersin und W. Logemann
Über den Einfluß von Oxydationsmitteln und Reduktionsmitteln
auf die Aktivität von Papain Z.phys.Chem. (Hoppe-Seyler)
220 (1933) 209
200. H.A. Krebs
Über Aktivierung proteolytischer Fermente
Naturwissensch. 18 (1930) 736
201. B.J. Finkle and E.L. Smith
Crystalline Papain: Number and Reaktivität of Thiol Groups
Chromatographic Behavior J.Biol.Chem. 230 (1958) 669
202. E.L. Smith
Active Site of Papain and Covalent High-Energy Bonds of Proteins
J.Biol.Chem. 233 (1958) 1392
203. N.C. Davis
Action of Proteolytic Enzymes on Some Peptides and Derivatives
Containing Histidin J.Biol.Chem. 223 (1956) 935
204. J.R. Kimmel and E.L. Smith
The Properties of Papain Adv. Enzym. 19 (1957) 267

205. E.L. Smith and M.J. Parker
Kinetics of Papain Action: III Hydrolysis of Benzoyl-L-Arginine
Ethyl Ester J.Biol.Chem. 233 (1958) 1387
206. J.W. Goodman
Immunologically Active Fragments of Rabbit Gamma Globulin
Biochemistry 3 (1964) 857
207. F.W. Putnam, L.T. Lynn and C.W. Eaxley
Site of Cleavage of γ -Globulins by Papain Fed.Proc. 20 (1961) 74
208. J.A.C. Parke and P.J. Avis
The Effect of Digestion With Papain and Pepsin Upon the Anti-
toxic Activity of Rabbit Antibody J.Immunol. 7 (1964) 248
209. H.F. Deutsch, J. Morton and C.H. Kratochvil
Antigenic Identity of Hyperglobulinemic Serum Components with
Proteins of Normal Serum J.Biol.Chem. 222 (1956) 39
210. A.B. Gutman
The Plasma Proteins in Disease Adv.Prot.Chem. 4 (1948) 155
211. F.W. Putnam, A. Miyake, F. Meyer
Chemical Characterization of Abnormal Human Serum Globulins
Fed.Proc. 14 (1955) 265
212. F. Lohss, A. Hillmann, Elies and G. Hillmann
Myelom-Plasma-Proteine, II Mitteilung zur phys. und chem. Natur
der γ und Myelomproteine Z.Naturf. 8b (1953) 619
213. F. Lohss, E. Weiler und G. Hillmann
Myelom Plasma-Protein III Mitteilungen zur Immunochemie der
 γ - Myelomproteine Z.Naturf. 8b (1953) 625
214. M. Harboe, C.K. Osterland, M. Mannik, H.G. Kunkel
Genetic Characters of Human γ -Globulins in Myeloma Proteins
J.Exp.Med. 116 (1962) 719
215. S.F. Velick, C. Parker and H.N. Eisen
Excitation of Energy Transfer and the Quantitative Study of the
Antibody Hapten Reaction Proc.Natl.Acad.Sci. 46 (1960) 1470
216. M.E. Noelken, C.A. Nelson, C.E. Buckley and C. Tanford
Gross Confirmation of Rabbit 7S γ -Globulin and its Papain-
cleaved Fragments J.Biol.Chem. 240 (1965) 218
217. A. Nisonoff and D.L. Woernley
Effect of Hydrolysis by Papain on the Combining Sites of an
Antibody Nature 183 (1959) 1325
218. S.F. Velick, C. Parker and H.N. Eisen
Excitation of Energy Transfer and the Quantitative Study of the
Antibody Hapten Reaction Proc.Natl.Acad.Sci. 46 (1960) 1470

219. D. Gitlin and E. Merler
Similarity of Peptides in Two Antigencombining Fragments released from a Rabbit Antibody by Papain Natur 190 (1961) 634

220. G. Weber
Rotational Brownian Motion and Polarisation of the Fluorescence of Solutions Adv.Prot.Chem. XIII (1953) 415

221. C.S. Chadwick and P. Johnson
Depolarisation of the Fluorescence of Proteins Labelled With Various Fluorescent Dyes Biochem.Biophys.Acta 53 (1961) 482

222. R.F. Steiner and H. Edelhoch
Structural Transitions in the Antibody and Normal γ -Globulins II Fluorescence Polarization Studies J.Am.Chem.Soc. 84 (1962) 2139

223. F. Franklin and Z. Dische
Asymetric Distribution of Sialic Acid and Fucose Fed.Proc. 21 (1962) 33

224. J. L. Fahey and B.A. Asconas
Enzymatically Produced Subunits of Proteins Formed by Plasma Cells in Mice J.Exp.Med. 115 (1962) 623

Herrn Priv.Doiz.Dr. M. K n e d e l möchte ich für die Überlassungen des Themas und die Anregungen bei der Arbeit und Herrn Prof.Dr. H. S c h w i e g k für die Arbeitsmöglichkeit in seinem Hause danken. Ebenso gilt mein Dank Herrn Dr. F a t e h und den Mitarbeiterinnen des Labors für ihre hilfreiche Unterstützung.

L E B E N S L A U F

Am 26. Juni 1941 wurde ich, Klaus Zeiller, in Landsberg am Lech als einziges Kind des Beamten Martin Zeiller und seiner Ehefrau Corona Zeiller, geb. Kagerbauer, geboren.

Von 1947 bis 1951 besuchte ich die Volksschule, von 1951 bis 1960 die Oberrealschule in Landsberg am Lech.

Nach dem Abitur begann ich im November 1960 mit dem Studium der Medizin an der Maximiliansuniversität in München. 1961 legte ich dort die naturwissenschaftliche Vorprüfung ab. 1963 bestand ich die ärztliche Vorprüfung; im August 1966 beendete ich mein Studium mit dem erfolgreichen Abschluß des Staatsexamens.

Seit 1. Oktober 1966 arbeite ich im Institut für Leder- und Eiweißforschung der Max-Planck-Gesellschaft in München.

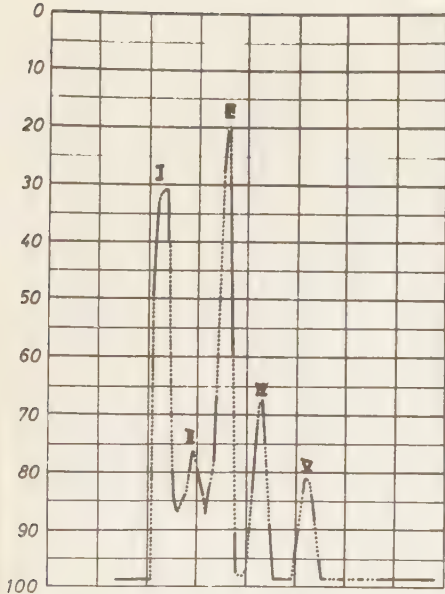
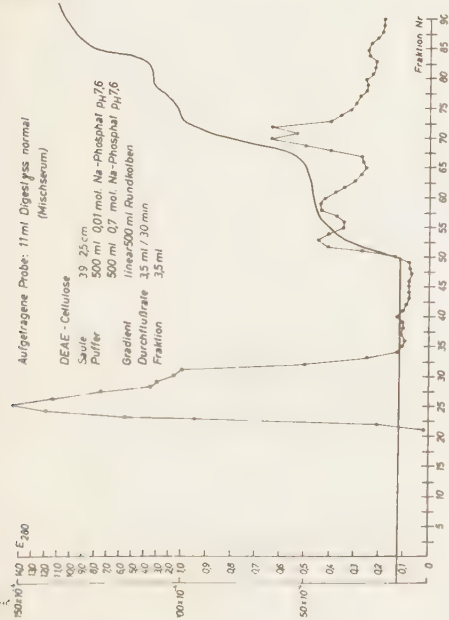


Abb. 1

Abb. 6



Aufgetragene Probe 15 ml Digest normal yss
(Einzelsärum)

DEAE - Sephadex

Säule 30 x 30 cm

Puffer 500 ml

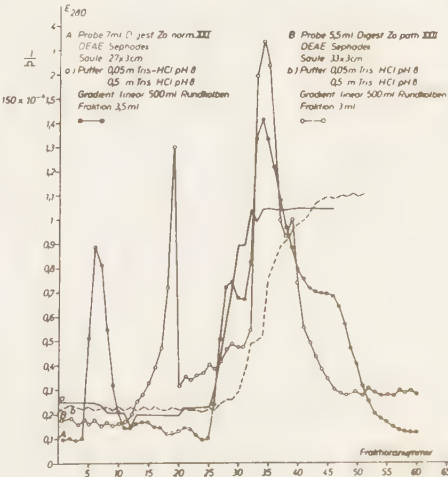
Gradient linear 500 ml Rundkolben

Durchflußrate 3.5 ml / 13 min

Fraktion 5.6 ml

Abb. 8

Abb. 14



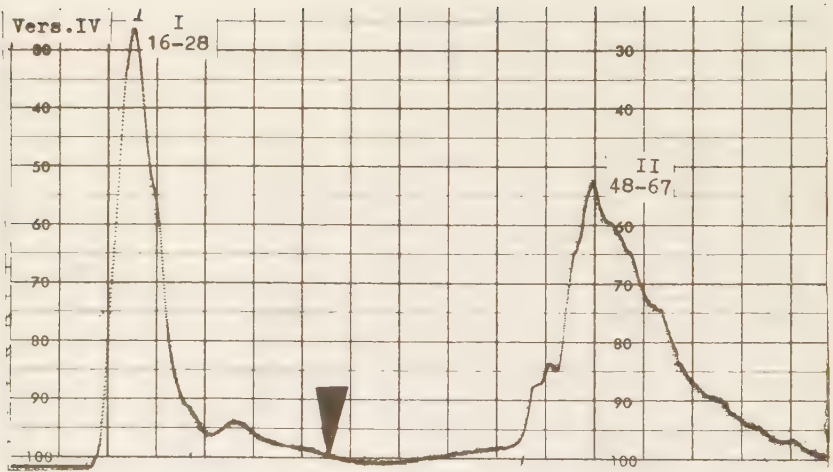


Abb. 2

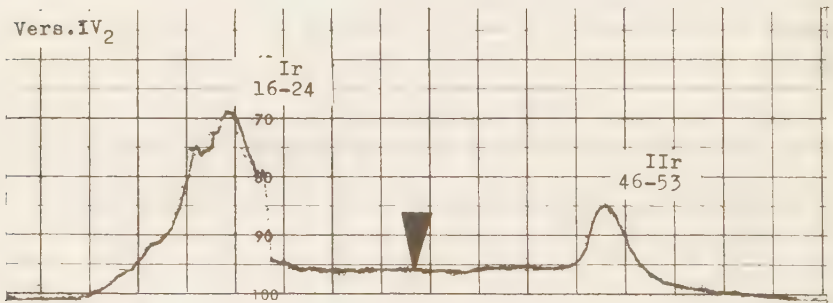


Abb. 3

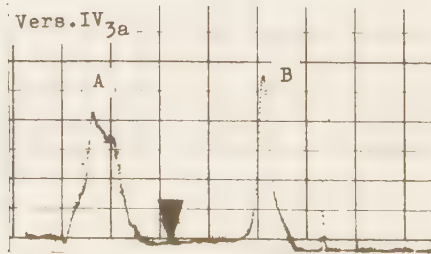


Abb. 4

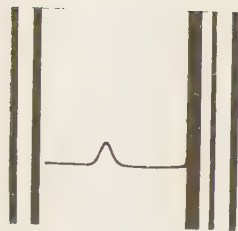


Abb. 10a

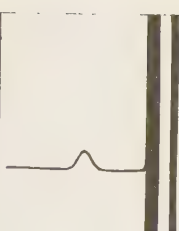


Abb. 10b

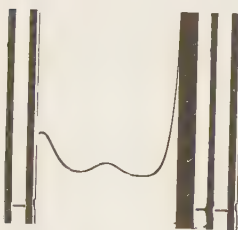


Abb. 10a

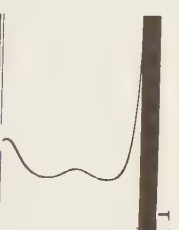


Abb. 10d

Abb. 10a

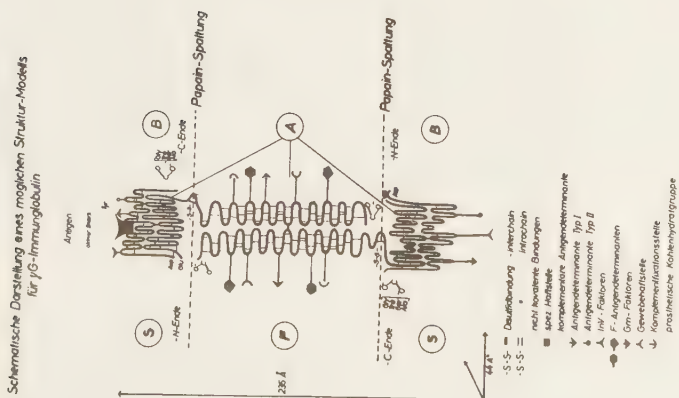
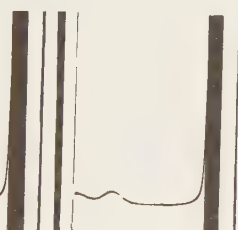


Abb. 23

Abb.9a
yG

Digest

Abb.9b
Digest

I

Abb.9c
II

Digest

Abb.9d
Digest

III

Abb.9e
IV

Digest

Abb.13a
Digest

yG Zo

Abb.13b
S

F

Abb.13c
Digest

yG Zo path

Abb.13d
Digest

Abb.13e
Digest

32-35 Zo path

Abb.13f
32-35

36-38

Abb.15a
Digest Ba

20-25

Abb.15b
Digest Ba

26-28

Abb.15c
Digest Ba

29-30

Abb.16a
Digest Pore

2 Pore

Abb.16b
Digest

61-63

Abb.5
Ir

IIr

Abb.7

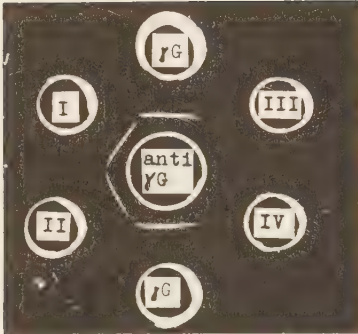


Abb. 11

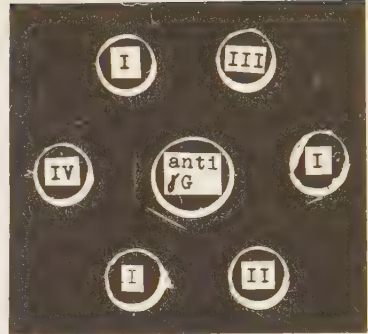


Abb. 12



Abb. 22

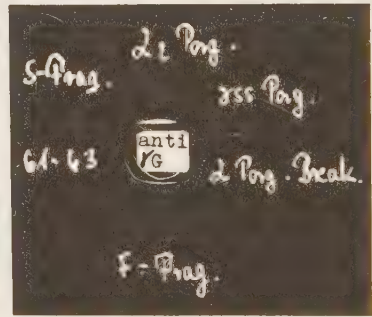


Abb. 20

Zo-path 36-38 Zo-path 14-19



Abb. 18.

Zo-norm 5-9 Zo-path 14-19



Abb. 17.

Zo-norm F Zo-path 32-35



Abb. 19

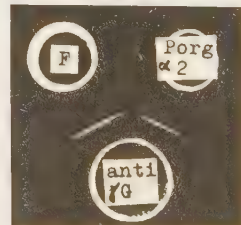


Abb. 21

